

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POSTGRADO



**Efecto analgésico de ketorolaco en un modelo
experimental de sumación temporal y espacial en
sapos espinales**

TESIS

para optar al grado Académico de Magíster en Farmacología

Mención en Farmacología Experimental

AUTOR

Roger López Bellido

Lima – Perú

2007

A Dios

***A mis padres,
María y Ferriol,
a mis tíos,
Aurea y Oswaldo,
por su constante e invaluable apoyo.***

***A mis hermanos,
Iris, Wilder, Zeida, Ferriol y Jimena,
Por su cariño y comprensión.***

***A Iris, César, Tatiana y Jesús,
por ser un arquetipo de familia.***

***A Wilder, Maruja y Fiorella
Por su relación armoniosa
y perseverante.***

***A mis primos
Cirilo, Sonia, Haydee y orlando
por su afecto y estima***

***A mis amigos por su amistad ilimitada:
Miguel Rodríguez, Jonny Burga, Víctor Chumpitaz,
Roberto Varas, Arturo Ramón, Elías Aguirre, Juan Zegarra.***

***Al Dr. Jorge Luís Arroyo Acevedo
por su gran apoyo,
preocupación y dedicación en todo momento.***

A
Katherine Barreto Valer,
mi Dulce Locura,
por su gran amor,
comprensión
y
su presencia distante.

Agradecimientos

Porque en el Perú se cree cada vez menos en las instituciones públicas, mi más sincero agradecimiento a CONCYTEC, una de las pocas instituciones que se preocupa en fomentar la investigación y la formación de investigadores, institución que renovó nuevamente mi confianza en el país. Al CONCYTEC mis agradecimientos por la subvención económica entregada que fue un gran acicate para realizar oportunamente la tesis. Al CONCYTEC por creer en las pocas personas quienes viven haciendo un poco de ciencia con pocos recursos y con grandes vicisitudes, pero aún así son soñadores.

A mi asesor, y amigo Dr. Jorge Luis Arroyo Acevedo, profesor de Farmacología de la Facultad de Medicina de la UNMSM por su guía académica, amistad y apoyo en la realización del presente trabajo de investigación.

A mi coasesor y amigo, Mg. Miguel Oscar Rodríguez Alfaro, profesor responsable de la cátedra de Farmacología de la Facultad de Odontología de la UNMSM, por sus consejos, amistad y guía académica en la realización del presente trabajo.

Al señor Alberto Cabezas Bedriñana, trabajador incansable y alma del departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la UNMSM por su ayuda presta y desinteresada, en todo momento, en la ejecución del presente trabajo de investigación.

ÍNDICE

Resumen	9
Abstract	10
I. Introducción	11
II. Marco teórico	12
2.1 Antecedentes	12
2.2 Bases teóricas	18
2.2.1 Dolor y mediadores involucrados	18
2.2.2 Modelos experimentales para el estudio del dolor	20
2.2.3 Glutamato y receptores de NMDA	20
2.2.4 Antagonistas de receptores NMDA	21
2.2.5 Acción de los AINEs sobre el sistema nervioso central	22
2.2.6 Ketorolaco y acción en el sistema nervioso central	24
2.2.7 Sumación espacial y temporal	25
2.3 Definición de términos	27
III. Materiales y métodos	28
3.1 Métodos	28
3.1.1 Tipo de estudio	28
3.1.2 Población y muestra	28
3.1.3 Universo	28
3.1.4 Tipo de muestreo	29
3.1.5 Muestra	29
3.1.6 Unidad de muestreo	29
3.1.7 Criterios de inclusión	29
3.1.8 Criterios de exclusión	29

3.2	Procedimientos	29
3.2.1	Aspectos éticos del manejo de animales de experimentación	29
3.2.2	Validación del método de sumación temporal y espacial	29
3.2.3	Actividad de ketorolaco frente a un antagonista no competitivo de receptores de NMDA	37
3.2.4	Actividad electromiográfica del músculo semimembranoso	39
3.2.5	Tratamiento estadístico	40
IV.	Resultados	41
4.1	Análisis descriptivo y pruebas de estadísticas para la validación del modelo de dolor agudo en sumación temporal y espacial	41
4.2	Análisis descriptivo y pruebas estadísticas para comparar la actividad del reflejo de retirada de la pata en sapos espinales tras la administración de ketorolaco, memantina y suero fisiológico	45
4.3	Evaluación electromiográfica del músculo semimembranoso	50
V.	Discusión	53
VI.	Conclusiones	59
VII.	Referencias bibliográficas	60
VIII.	Anexos	66

Efecto analgésico de ketorolaco en un modelo experimental de sumación temporal y espacial en sapos espinales

Resumen

El propósito de la investigación fue determinar la acción analgésica de ketorolaco en sapos espinales empleando el modelo experimental de dolor agudo en sumación temporal y espacial. La acción de analgésica de ketorolaco se evaluó por la cuantificación del reflejo de retirada de la pata y evaluación electromiográfica. La muestra fue conformada por 140 sapos que fueron seleccionados de acuerdo a los criterios de inclusión, divididos en: 1) 90 sapos para la validación del modelo experimental de dolor agudo; 2) 30 sapos para comparar la actividad del ketorolaco frente a memantina; 3) 20 sapos para evaluar la actividad electromiográfica del músculo semimembranoso. El análisis estadístico fue realizado empleando el software SPSS versión 14.0 para Windows. Se realizaron análisis descriptivos y pruebas estadísticas de significancia Kruskal Wallis y la prueba U de Mann Whitney. Los resultados encontrados demuestran que el ketorolaco disminuye el reflejo de retirada de la pata de los sapos espinales inducido por ácido sulfúrico empleando el modelo experimental de dolor agudo de sumación temporal y espacial, ketorolaco produjo también disminución de la actividad electromiográfica del músculo semimembranoso en frecuencia y amplitud.

En conclusión, ketorolaco, en condiciones experimentales, tiene un efecto analgésico al ser empleado en el modelo experimental de sumación temporal y espacial en sapos espinales.

Palabras clave: ketorolaco, receptores de NMDA, sumación temporal y espacial, modelo experimental de dolor agudo

Analgesic effect of ketorolac using an experimental model of temporal and spatial summation in spinal toads

Summary

The purpose of the research was to determinate the analgesic effect of ketorolac in spinal toads using the experimental acute pain model of temporal and spatial summation. The analgesic Ketorolac action was evaluated by the quantification of the toad's leg rise reflection and electromyography activity evaluation. The sample was conformed for 140 toads, that were selected according to the inclusion criteria divided in: 1) 90 toads to validation of experimental acute pain model; 2) 30 toads to compare the ketorolac activity against memantine; 3) 20 toads to evaluate the electromyography activity of semimembranosus muscle. Descriptive analyses, Kruskal Wallis and U Mann Withney statistical analyses were made with SPSS 14.0 software for Windows. The research had showed that Ketorolac reduced the toad's leg rise reflection induced by sulfuric acid using the experimental acute pain model of temporary and spatial summation in spinal toads. In addition, ketorolac also reduced the electromyography activity in frequency and amplitude of the semimembranosus muscular contraction.

In conclusion, ketorolac showed analgesic effect using an experimental model of temporal and spatial summation in spinal toads.

Key words: Ketorolac, NMDA receptors, temporal and spatial summation, experimental acute pain models

I. Introducción

El dolor es una constante que se presenta posterior al acto postquirúrgico. Recientes investigaciones muestran que después de un acto quirúrgico se provocan cambios locales que van a incrementar la excitabilidad de las neuronas periféricas y en la médula espinal lo cual contribuye a la severidad del dolor postquirúrgico.^{1,3} Los receptores de NMDA han sido sugeridos como críticos para el desarrollo de la sensibilización a nivel del sistema nervioso central, los cuales tal vez amplifiquen el dolor postquirúrgico.^{1,3} Hay evidencias de que la transmisión glutamatérgica en receptores de NMDA es un mecanismo para incrementar la sensibilidad algésica a nivel del sistema nervioso central^{3,5} y tienen un rol protagónico en las respuestas hiperalgésicas que aparecen después de una lesión periférica o inflamación.²²

Los AINEs no solo tendrían su acción analgésica por inhibición de las cicloxigenasas (COXs)² sino además antagonizarían los receptores de NMDA³ a nivel central. Esto explicaría el empleo frecuente del ketorolaco en diversos actos postquirúrgicos.

En la mayoría de los estudios experimentales de dolor agudo, se emplean animales en estado consciente lo que influye en las respuestas dolorosas de los animales, ya que el dolor se puede modular en el asta dorsal de la médula espinal. El estado conciente de animal dificulta la interpretación de los resultados obtenidos y es una limitante para poder evaluar el dolor fidedignamente.

Los objetivos de la presente investigación fueron: 1) Validar el modelo experimental de dolor agudo en sumación temporal y espacial a través del reflejo de retirada de la pata del sapo espinal provocado por ácido sulfúrico con el fin de disponer de un test farmacológico de evaluación de dolor; 2) Comparar la actividad analgésica de ketorolaco con un antagonista no competitivo de receptores de NMDA utilizando el modelo experimental de sumación temporal y espacial; y 3) Evaluar la actividad electromiográfica de la contracción muscular del músculo semimembranoso al exponerse al ácido sulfúrico el tercio distal del dedo largo de la pata trasera de sapos espinales.

II. Marco teórico

2.1 Antecedentes

En la revisión bibliográfica sobre el mecanismo de antinocicepción de los AINEs tanto a nivel periférico y central Burian M. et al.¹ sostienen que la ciclooxigenasa (COX -2) es la que se produce más a nivel central que la COX-1, esta COX-2 es inducida por el factor nuclear tumoral alfa (FNT- α), interleuquina 1-beta (IL-1 β). Ante un estímulo nocivo las neuronas periféricas en el asta dorsal en la médula espinal provocan la liberación de glutamato y sustancia P, además de producir PG E₂ producto de la COX-2. El glutamato ejerce acción en receptores de NMDA y AMPA lo que va a provocar una respuesta dolorosa.

Burian M. et al.² estudiaron los efectos antihiperálgicos periféricos y centrales del diclofenaco (oral vs tópico) en un modelo experimental de dolor inflamatorio en humanos. El diclofenaco, después de una hora de administración tópica, fue más efectivo que por la vía oral, alcanzando una alta concentración tisular. El diclofenaco oral presenta una gran eficacia antihiperálgica de 2-2.5 horas luego de su administración, cuando la concentración tisular para ambas vías de administración no muestra diferencias significativas. La gran eficacia antihiperálgica del diclofenaco se sugiere un mecanismo a nivel del SNC.

Sotgiu ML. et al.³ determinaron que la excitación inducida por N-metil-D-aspartato (NMDA) sobre neuronas de amplio rango dinámico fue prevenido o reducido por la aplicación previa o posterior de ketorolaco después del comienzo de la eyección de NMDA. Los datos sugieren que el ketorolaco puede poseer su efecto analgésico central por la interferencia con la actividad del receptor del NMDA en neuronas espinales.

Romundstad et al.⁴, en el estudio realizado en voluntarios sanos, investigaron la combinación de propacetamol (acetaminofen) y ketorolaco sobre el dolor por presión, determinando que la tolerancia repetida a presiones dolorosas (PPTT) disminuía en los voluntarios quienes recibieron 30 mg de ketorolaco y 2 gr de propacetamol. Este aumento del PPTT se debería al sinergismo de las propiedades analgésicas del ketorolaco y paracetamol, ya que el paracetamol inhibiría la sintasa de óxido nítrico y estimularía el mecanismo antinociceptivo de la serotonina a nivel supraespinal.

Los receptores de NMDA han sido sugeridos como críticos para el desarrollo de la sensibilización a nivel del SNC; los cuales, tal vez, amplifiquen el dolor postoperatorio. Hay abundantes evidencias de que la transmisión glutamatérgica en receptores de

NMDA es un mecanismo para incrementar la sinapsis y la inducción del sistema nervioso central. Nishimura et al.⁵ demostraron que los receptores de NMDA conteniendo la subunidad GluR2 están implicados en el dolor postoperatorio en ratones mutantes.

Bolshavok et al.⁶, en el estudio de diseño de antagonistas para receptores NMDA y AMPA en ratas de 13 a 20 días de edad, estudiaron tres cationes orgánicos: mono y dicaciones derivados de adamantina, fenilciclohexil, trifenilmetano y difenilmetano. El antagonismo de estas tres drogas fue estudiado sobre receptores nativos de neuronas de ratas y sobre la recombinación de receptores GluR1 expresado por *Xenopus oocytes*. El análisis de la actividad-estructura sugiere que todos los monocationes orgánicos derivados de adamantina (fenilciclohexil y IEM-1618) son antagonistas selectivos de receptores de NMDA y a la vez fueron mucho menos efectivos sobre los receptores AMPA.

La inyección intraperitoneal de toxinas, así como endotoxinas, lipopolisacáridos (LPS) está asociada con la caracterización del incremento de la sensibilidad al estímulo doloroso (hiperalgesia). Johnston et al.⁷ demostraron que la inhibición de la analgesia por morfina 24 horas, después de una simple inyección intraperitoneal de LPS, tiene mecanismos que contribuyen a la hiperalgesia y el desarrollo de tolerancia analgésica a la morfina. Específicamente, la analgesia por morfina fue restaurada si los LPS eran precedidos por la administración sistémica de antagonistas no competitivos de receptores de NMDA (MK-801 por infusión espinal de un inhibidor metabólico (Fluorocitrato), o la microinyección intracerebroventricular de un antagonista de receptores opiodes (Naloxona). Los resultados demuestran que los LPS inhiben la analgesia brindada por morfina.

Lee et al.⁸ estudiaron la respuesta antinociceptiva tras la administración de NMDA en el área orofacial. Para este propósito, los efectos de la administración intracisternal de NMDA sobre el test de formalina orofacial fueron monitorizados por el libre movimiento de las ratas. Los investigadores también estudiaron el mecanismo de la respuesta antinociceptiva del NMDA. El estudio se realizó en 80 ratas Sprague-Dawley machos. Los resultados sugieren que la administración de NMDA intracistema produce disminución de la respuesta de la conducta dolorosa y también produce caída del efecto antinociceptivo en el test orofacial de formalina, los opiodes de la misma forma parecen estar envueltos en la inducción antinociceptiva en el área orofacial.

Kim et al.⁹ evaluaron la administración de interleuquina-1 β intracisternalmente para inhibir la respuesta de comportamiento evocada por NMDA en el área orofacial de

movimientos libres en ratas, para ello emplearon 90 ratas Sprague-Dawley con pesos de 300-350g. La interleuquina 1- β derivada del cerebro ha sido involucrada en la modulación del proceso nociceptivo. Los resultados sugieren que las citoquinas inyectadas intracisternalmente parecen producir efectos antinociceptivos en el modelo de dolor evocado por NMDA del área orofacial, y el efecto antinociceptivo parece ser mediado por vía de los opiodes.

Christoph et al.¹⁰ estudiaron el posible mecanismo periférico del efecto antialodínico de antagonistas que actúan en el lugar glicina_B en receptores NMDA periféricos en ratas machos Sprague-Dawley. Se administraron dos antagonistas de sitios de glicina_B en receptores NMDA (5,7-DCK y L-701,324) en dos modelos de dolor neuropático en ratas. L-701,324 fue estadísticamente más significativo en la inhibición central de la actividad evocada por receptores NMDA. Así mismo, los autores sugieren que los receptores periféricos de NMDA, tal vez, contribuyan substancialmente a la eficacia de antagonistas en dolor neuropático.

Yasushi et al.¹¹ reportaron un protocolo para la determinación de la localización de varios receptores sobre neuronas colinérgicas en varias regiones del cerebro. Los investigadores aplicaron el método para investigar receptores GABA y NMDA localizados sobre el estrato de neuronas colinérgicas en ratas. Cuando el estrato de neuronas colinérgicas fue selectivamente destruida por administración intraestratal de neurotoxina colinérgica, ión de etylcolina mustard aziridinium, el número de receptores de GABA_A y NMDA decrece. Sin embargo, no significó cambios sobre receptores de GABA_B. Estos resultados sugieren que los receptores NMDA y GABA_A, pero no GABA_B están localizados sobre neuronas colinérgicas en el stratum.

La cápsula lateral del núcleo central de la amígdala es ahora definida como la “amígdala nociceptiva” por su alta concentración de neuronas que son activadas exclusivamente o preferencialmente por estímulos nocivos. Weidong¹² indujo artritis, por administración de carragenina / kaolin en la rodilla de las ratas. Se comparó la actividad de un antagonista selectivo de receptores de NMDA (AP5) y un bloqueante no selectivo de receptor de NMDA (NBQX). Los datos obtenidos del estudio señalan que el antagonista selectivo de receptores de NMDA (AP5) inhibió las respuestas al estímulo nocivo de dolor de artritis e incrementó la respuesta a estímulos inocuos en artritis. El bloqueante no selectivo de receptor de NMDA (NBQX) inhibió la actividad y evocación bajo respuestas en condiciones normales y artritis. Estos datos sugieren que la activación de ambos receptores de NMDA y no NMDA contribuyen al dolor relacionado con la sensibilización de neuronas de la amígdala.

La excitotoxicidad por glutamato ha sido implicada en la enfermedad de Alzheimer y Parkinson. Los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) reducen el riesgo de padecer la enfermedad de Alzheimer a través de mecanismos poco claros. Casper et al.¹³ examinaron los efectos de la aspirina, acetaminofén e ibuprofeno sobre células embrionarias neuronales de mesencéfalo de rata, que es el área primaria afectada en la enfermedad de Parkinson. El ibuprofeno disminuyó significativamente el decremento de dopamina causada por glutamato indicando la preservación de la integridad neuronal. Así, los AINES protegen las neuronas contra la excitotoxicidad in vitro y se perfilan como agentes neuroprotectores contra la enfermedad de Parkinson.

Los procesos inflamatorios en el sistema nervioso central, se piensan, pueden contribuir a la enfermedad de Alzheimer. Mesches et al.¹⁴ con la administración crónica de los AINES encontraron que estos fármacos disminuyen la incidencia de la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo hay pocos estudios, sobre el impacto de la administración crónica de AINES.

La cirugía causa comúnmente dolor y plasticidad neural que son únicos comparado a otros problemas persistentes de dolor. Zahn et al.¹⁵ desarrollaron un estudio usando la incisión plantar como modelo de dolor postoperatorio, para lo cual examinaron el rol de receptores ionotrópicos de aminoácidos excitatorios en la sensibilización del asta dorsal de la médula espinal en la sensibilización temprana después de la incisión. Los resultados del estudio demuestran que NBQX un antagonista de receptores de NMDA inhibió la sensibilización central en el asta dorsal de la médula, más no así el MK-801 antagonista de receptores no NMDA.

Parsons¹⁶ en una revisión bibliográfica sobre el papel de receptores de NMDA periféricos y centrales expone que la hiperalgesia y alodinia son desarrollados por injuria del tejido nervioso periférico, que no solamente incrementa la intensidad de la sensibilidad de los nociceptores aferentes en el lugar de la injuria, pues también dependen de la receptores de NMDA que median cambios a nivel central en la excitabilidad sináptica. Desafortunadamente la mayoría de agentes que bloquean los receptores de NMDA causan numerosos efectos colaterales así como deterioro de la memoria, efectos psicotomiméticos, ataxia e incoordinación motora. Datos recientes indican que los receptores de NMDA estarían involucrados en dolor e inflamación visceral. Además algunos estudios señalan que habrían receptores de NMDA a nivel periférico que serían en un futuro blanco para nuevos fármacos y una buena alternativa para su uso para la prevención de dolor por su bloqueo a nivel periférico y así tener menores efectos adversos a nivel de SNC.

Palazzo et al.¹⁷ evaluaron la posible contribución de receptores de glutamato metabotrópicos (mGLURs) en la antinocicepción inducida en la sustancia negra periacueductal en ratas Wistar machos (250-300g). Los datos obtenidos sugieren que el glutamato endógeno podría modular la nocicepción a través de receptores metabotrópicos de glutamato y receptores de NMDA en la sustancia gris periacueductal. La estimulación fisiológica de estos receptores parece requerir la inducción de cannabinoides en la analgesia en el cerebro medio.

El objeto del estudio de Harris et al.¹⁸ fue determinar el rol de los receptores metabotrópicos del grupo I, la subunidad NR2B de receptores de NMDA, así como también los receptores NK1 y NK3 en conejos descerebrados. Los datos obtenidos del estudio confirman la importancia de los receptores de NMDA como críticos en el proceso de sensibilización central pero no solo estipula el rol de los receptores metabotrópicos del glutamato sino también deben ser bloqueados simultáneamente los receptores de taquikinininas para la hiperalgesia.

El rol de preparados de complejo B como coadyuvante analgésico es controversial. Reyes et al.¹⁹ caracterizaron la potenciación del efecto antinociceptivo del diclofenaco por preparados de complejo Vitamina B usados en un modelo de dolor inducido de deterioro funcional en ratas. La administración de cianocobalamina incrementa significativamente la antinocicepción inducida por la administración de diclofenaco. La sumación temporal es un reflejo de dolor secundario a nivel del asta dorsal de la médula espinal y es una forma de nocicepción a nivel del SNC. En experimentos animales y humanos en las neuronas de amplio rango dinámico se ha demostrado que está regida por receptores de NMDA y de la sustancia P (Staud et al).²⁰

El dolor forma parte de los sistemas que tiene el organismo para mantener la homeostasis. En circunstancias fisiológicas tiene una función protectora pero existen patologías en que el dolor se convierte en un síntoma capital que llega a ser el centro de la enfermedad. La investigación básica y clínica ha avanzado mucho en los últimos años en su intento de conocer a fondo los mecanismos íntimos de la nocicepción. Esto ha sido posible gracias a los modelos animales de dolor. Es necesario que este tipo de investigaciones se realicen bajo las orientaciones de unas guías éticas para la experimentación con animal consciente. Ortega et al.²¹ plantean que los modelos de dolor agudo y crónico son útiles para el estudio y desarrollo de nuevos tratamientos farmacológicos, sin embargo hay circunstancias que pueden dificultar la interpretación de los resultados obtenidos. La irrupción de técnicas que inducen modificaciones genéticas en los animales de experimentación donde generalmente se emplean ratones

está permitiendo la comprobación de los conocimientos que hasta ahora se habían concluido en base a los estudios farmacológicos.

Los receptores de NMDA parecen desempeñar una función poco importante en las respuestas nociceptivas provocadas por la estimulación aguda de tejidos somáticos normales interviniendo, eso sí, en las respuestas hiperalgésicas que aparecen después de una lesión periférica o inflamación. Olivar et al.²² al evaluar la función de los receptores de NMDA en el procesamiento de los estímulos dolorosos viscerales frente a los estímulos dolorosos somáticos en el uréter izquierdo de ratas Wistar, hembras adultas, encontraron que los antagonistas de los receptores de NMDA inhiben los reflejos nociceptivos provocados en el uréter normal, y sugieren que los receptores de NMDA están implicados en el procesamiento de los estímulos nociceptivos agudos en las vísceras.

González-Darder²³ analiza los modelos animales de dolor actualmente aceptados por la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP), describiendo sus características y utilidad. Se describen los aspectos éticos a ser tenidos en cuenta para el diseño de modelos y experiencias con modelos animales de dolor. Finalmente, se describen las características que debe cumplir un modelo animal de dolor para ser validado.

2.2. Bases teóricas

2.2.1. El dolor, mediadores involucrados

El dolor es una constante que acompaña a la mayoría de procedimientos quirúrgicos. Es una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con daño, real o potencial, a los tejidos. (International Association for the Study of Pain; IASP) ⁵³.

El daño tisular asociado con el inicio de la cirugía, un cambio local en la sensibilidad de los nociceptores y también la estimulación de la sensibilización central (un incremento en la excitabilidad de neuronas en la médula espinal) tal vez contribuyan a la severidad del dolor postoperatorio⁵. A nivel central no solo los receptores de NMDA están involucrados (sensibilización del asta dorsal de la médula espinal)¹⁵. Además de los receptores de NMDA se tiene evidencias de otros receptores como los receptores no NMDA (AMPA y Kainato), takinininas y neurokininas^{5,18,37}.

La transmisión de la señal nociceptiva de neuronas nociceptivas primarias hacia el nociceptor secundario en el asta dorsal de la médula espinal envuelve^{1,3} un sistema amplio de neurotransmisores¹. Con el descubrimiento de aminoácidos excitatorios así como glutamato en el sistema nervioso central diferentes líneas de investigación evidencian la implicancia del glutamato como neurotrasmisor excitatorio en la médula espinal⁸. Diferentes factores también han sido mostrados en la iniciación y el mantenimiento de la nocicepción⁹. Un importante grupo de moléculas pronociceptivas son los prostanoïdes en este grupo se incluye a PGs, PGI₂ y PGE₂, ambas relacionadas con la producción de dolor en ratas al ser administradas periféricamente¹. Los prostanoïdes también se sintetizan y poseen una acción central,^{28,31,32} los niveles de PGE₂ se incrementan en la médula espinal después de la activación de los nociceptores a nivel periférico.

El asta dorsal de la médula espinal es un lugar importante en la integración y la modulación de la transferencia sináptica de la entrada de estímulos nerviosos de la periferia al SNC, varios neurotransmisores median esta información; péptidos como sustancia P, neurokinina A (NKA) el péptido del gen relacionado con la calcitonina. (GGRP) así también aminoácidos excitatorios como glutamato actúan en lugares específicos y juegan un rol importante en la hiperexcitabilidad, contribuyendo así a la generación de Wind-Up (Mendell & Wall, 1965; Mendell, 1966)^{56,57} y sensibilización central³⁷.

La inyección del ácido de NMDA en la médula espinal de roedores usualmente ha sido reportado como inductor de reacciones de hiperalgesia o comportamientos aversivos

consistentes en: morder, arañar y lamer⁸. Existen también evidencias electrofisiológicas de que los receptores de aminoácidos excitatorios median la transmisión sináptica¹⁸ de la información somatosensorial en el asta dorsal de la médula espinal.^{1,3} Estos resultados sugieren que el glutamato es un neurotransmisor excitatorio¹⁸ que juega un rol importante en la transmisión del dolor en la médula espinal y los núcleos trigeminales⁸.

Además del neurotransmisor excitatorio, glutamato, la IL-1 β ha sido implicada en la modulación de la respuesta nociceptiva en la médula espinal, pero esta citoquina es liberada por macrófagos y monocitos durante la infección y juega un rol importante en la respuesta inflamatoria aguda⁹.

La PGE₂ produce la activación electrofisiológica de las neuronas del asta dorsal para la facilitación de la liberación del neurotransmisor¹, despolarización directa de la membrana postsináptica e inhibición de la activación del receptor de glicina. Los prostanoideos son productos del metabolismo de ácido araquidónico por COX, una enzima que consta de dos isoformas COX-1 y COX-2⁴², y una nueva variante de la COX-1 descrita en los trabajos experimentales como COX-3³⁰⁻³².

La COX-3 es expresada a nivel del SNC en monocitos y células endoteliales por lo que es considerada uno de los mediadores de inflamación y dolor en SNC en caninos³¹ y humanos³². Esta distribución de COX-3 explica los mecanismos de acción de acetaminofen a nivel central sobre la fiebre y el dolor.²⁸ Representa el 30% de los niveles de mRNA de COX-1³², en cerebro y médula espinal.³³

El dolor también tiene un componente emocional fuerte y esto es generalmente asociado a afectos como depresión y ansiedad los que se cree son mediados a través de circuitos que se relacionan con la amígdala¹². La amígdala es una estructura del lóbulo temporal medial y comprende diferentes estructuras anatómicas y distintos núcleos funcionales. El núcleo central de la amígdala proporciona la salida de la mayoría de funciones incluyendo el control de la modulación del sistema descendente del dolor. La cápsula lateral del núcleo central de la amígdala es definida ahora como amígdala nociceptiva por la gran cantidad de neuronas que procesan la información nociceptiva¹².

Estudios experimentales evidencian que la transmisión glutamatérgica en receptores NMDA es un mecanismo para un incremento en la transmisión sináptica y la inducción de la sensibilización a nivel del SNC¹. Muchos estudios han demostrado que la nocicepción y la hiperalgesia son mediados por receptores de NMDA^{5,17,22}. Si los

receptores de NMDA están involucrados en dolor postoperatorio, que subunidad es responsable, es algo que algunos estudios tratan de revelar⁵.

2.2.2. Modelos experimentales para el estudio del dolor

Los modelos de dolor agudo y crónico son útiles para el estudio y desarrollo de nuevos tratamientos farmacológicos, sin embargo hay circunstancias que pueden dificultar la interpretación de los resultados obtenidos (Ortega et al., 2002)²¹. Casi todas las investigaciones sobre el dolor emplean animales en estado consciente (Ortega et al., 2002; Gonzáles- Darder., 2000)^{21,23} lo que va a influir en las respuestas dolorosas que presenten los animales. El dolor puede ser modulado a nivel del SNC, por lo que algunas respuestas dolorosas pueden ser modificadas en el sistema ascendente que conduce los impulsos nerviosos o el sistema descendente que disminuye la entrada de impulsos nerviosos o estimula la liberación de opiáceos endógenos.

Los modelos conocidos y estudiados para el estudio del dolor en animales son: el test de retirada de la cola de la rata ante un estímulo térmico (Tail-flick test), test del plato caliente (Hot-plate test), estimulación de la pulpa dental, test del formol. Todos estos modelos se realizan en animales en estado consciente (Gonzáles- Darder., 2000)²³.

2.2.3. Glutamato y receptores de NMDA

El glutamato es conocido como el neurotransmisor de la sensibilización del circuito nociceptivo y los receptores de NMDA han sido mostrados como los más importantes receptores implicados en el mecanismo del dolor agudo y crónico y parecen ofrecer una prometedora alternativa para la terapéutica antihiperalgésica¹⁸.

De acuerdo a muchos estudios un rol crucial en el mecanismo de procesamiento de la información nociceptiva a nivel de la médula espinal es atribuido a los receptores ionotrópicos de NMDA³. La activación de estos receptores es la base de la sensibilización central, asociada con hiperalgesia, inducida por daño periférico incluyendo trauma quirúrgico. Así fármacos que interfieren con la actividad de los receptores de NMDA pueden ser importantes para alcanzar algún control de señales nociceptivas^{3,18}. La sensibilidad dolorosa también envuelve la activación paralela de diferentes tipos de receptores: takiquininas, NMDA y receptores no NMDA¹⁸.

El glutamato activa dos clases mayores de receptores: ionotrópicos y metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos son clasificados en 3 subclases: AMPA, NMDA y Kainato. Existen varias evidencias clínicas de que la hiperalgesia y alodinia producidas a nivel periférico o la injuria nerviosa no son los únicos en incrementar la sensibilidad primaria

de los nociceptores aferentes. Los receptores de NMDA median cambios en la excitabilidad sináptica central¹⁶. Estudios de farmacología molecular han revelado la existencia de al menos 8 receptores metabotrópicos de glutamato mGlu (mGlu1-mGlu8). Los receptores mGlu1 y mGlu5 activan a la fosfolipasa C y están incluidos en el grupo I, otros receptores tienen efectos negativos sobre la adenililciclase (mGlu2 y mGlu3) y son del grupo II y del grupo III (mGlu4, mGlu6, mGlu7, mGlu8); sin embargo el rol que poseen en el procesamiento del dolor todavía está lejos de establecerse¹⁷.

El receptor ionotrópico de NMDA está compuesto de dos subunidades GluR ζ (NR1) y GluR ϵ (NR2) y la diversidad molecular de la familia de la subunidad GluR ϵ (GluR ϵ 1-GluR ϵ 4) es considerada como el que provee la heterogeneidad funcional de los receptores canal iónico de NMDA⁵.

Además de las diferencias de los agonistas en los dominios de reconocimiento, los receptores de NMDA y AMPA forman diferentes canales iónicos. Los canales de receptor de NMDA tienen una conductancia de ~ 50 ps, son altamente permeables al calcio y son bloqueados por magnesio⁶.

En diferentes experimentos con inyección de antagonistas de NMDA se ha demostrado que los receptores periféricos de NMDA contribuyen también en la sensibilización bajo condiciones de inflamación e injuria tisular. Sin embargo el potencial terapéutico de los antagonistas de receptores de NMDA para el tratamiento de dolor neuropático permanece desconocido²².

El receptor de NMDA por lo tanto juega un rol primordial en la nocicepción y la transmisión somatosensorial. Los antagonistas de NMDA han sido probados para el tratamiento de dolor crónico, incluyendo dolor neuropático. Estos antagonistas se cree inhiben la sensibilización central, sin embargo su uso clínico es limitado pues producen además del efecto analgésico efectos adversos como alucinaciones y ataxia¹⁰. La liberación de glutamato en la periferia en las neuronas nociceptivas primarias ha sido sugerida en la modulación de excitabilidad aferente bajo condiciones de injuria tisular e inflamación¹⁰.

2.2.4. Antagonistas de receptores de NMDA

La inhibición funcional de receptores de NMDA puede ser lograda a través de acciones en diferentes lugares de reconocimiento como en lugares primarios (competitivos), lugar de la glicina (glicina_B) insensible a estricnina, sitio de poliaminas (selectivos de NR2B) y el lugar de acción de la fenciclidina localizado dentro del canal catiónico. Los

bloqueantes de canal de NMDA actúan de forma incompetitiva “dependientes del uso” significando que ellos solo bloquean el canal en un estado abierto ¹⁶.

MK-801, fenciclidina, ketamina memantina, aminoacridina, amidas poliaminas y muchos compuestos relacionados son bloqueantes de receptores de NMDA en concentraciones micromolares¹⁴.

Desafortunadamente, los antagonistas que bloquean completamente los receptores de NMDA causan numerosos efectos adversos como pérdida de memoria, efectos psicotomiméticos, ataxia e incoordinación motora, además de producir una pérdida o disminución de la transmisión sináptica normal¹⁶. El desafío es por lo tanto desarrollar antagonistas de receptores de NMDA que prevengan la activación patológica pero no impedir la activación fisiológica²².

El rol que presentan los receptores de NMDA en la nocicepción visceral e inflamatoria ofrece un blanco atractivo para los antagonistas de receptores de NMDA que no crucen la barrera hematoencefálica, evitando así efectos a nivel del SNC y produciendo anitnocicepción en receptores periféricos de NMDA¹⁶. El uso de agonistas opiodes (morfina) y antagonistas de receptores de NMDA previene el desarrollo de tolerancia a los opiodes en el tratamiento del dolor crónico, lo que muestra la importancia de receptores de NMDA en procesos dolorosos⁷.

Antagonistas del receptor ionotrópico de NMDA incluyendo memantina inhiben el desarrollo de la tolerancia a la morfina³⁴. Estudios recientes han mostrado que la combinación de antagonistas de receptores de NMDA, agonistas de receptores μ opiodes (morfina) o agonistas de α_2 adrenoceptores como clonidina, resultan en un incremento de la actividad analgésica en modelos animales de dolor³⁷. Así los resultados de la combinación de antagonistas de receptores de NMDA con morfina o clonidina tal vez sea una nueva forma de tratar estados de dolor crónico, sin embargo la naturaleza de estas interacciones permanece aún desconocida³⁷. Memantina y neramexana fueron seleccionados como antagonistas representativos de receptores NMDA por poseen un mecanismo de bloqueo del canal voltaje dependiente de NMDA. La memantina también potencia el efecto antihiperlagésico de la clonidina³⁷.

2.2.5 Acción de los AINES en el sistema nervioso central

Los AINEs son los fármacos más ampliamente usados en la terapéutica del dolor e inflamación^{1,2,3}.

La eficacia de los AINEs en la disminución del dolor es el resultado de su capacidad de inhibir la COX-1 y COX-2 cuya acción enzimática es producir la síntesis de prostaglandinas^{2,42}. La COX-2 es la isoforma predominantemente expresada en tejidos injuriados y una fuente principal de prostanoïdes durante la inflamación¹. Aunque la inducción de la expresión de COX-2 por estímulos inflamatorios es mayormente responsable de altos niveles de prostanoïdes en el lugar de inflamación, el rol de COX-1 en la modulación de la respuesta inflamatoria no debe ser menoscabado ya que en ratones con deficiencia del gen de COX-2, la COX-1 juega un rol en la percepción del dolor^{1,29,31}.

La dos isoformas COX-1 y COX-2 están relacionados en la reacción inflamatoria⁴² y tal vez contribuyan en la sensibilización periférica donde la respuesta inicial de los prostanoïdes es dependiente de COX-1 y COX-2^{1,42}, en particular del incremento de PGE₂, que juega un rol importante en la sensibilización periférica de terminaciones libres a estímulos nocivos^{1,2}. En contraste a la situación en la periferia ambos mRNA de COX-1 y COX-2⁴² son expresados constitutivamente en neuronas y elementos no neuronales de la sección cervical y lumbar de la médula espinal¹. COX-2 parece ser la isoforma predominante y esta presente en neuronas de todas las láminas, particularmente en las capas superficiales de motoneuronas y células no neuronales como los astrocitos¹. La mayor síntesis de PGs proviene de la COX-2² en el asta dorsal de la médula espinal, esto talvez contribuya al proceso nociceptivo¹.

En la médula espinal hay diferencias significativas en la producción de las COXs, el incremento de las interleuquinas, IL-1 α y IL-1 β , va a inducir una mayor producción de la COX-2⁹, regulación ascendente, que es paralela a la elevación substancial de PGE₂ en fluido cerebral y el comportamiento hiperalgésico de los animales¹. Así COX-2 en la médula espinal parece tener un rol mayor en la elevación de PGE₂ durante la inflamación periférica y es la mayormente responsable para la hipersensibilidad central observada en la inflamación^{1,2}.

A nivel neuronal la prolongada actividad en aferentes primarios pequeños generada por la inflamación local resulta en la liberación evocada de glutamato/aspartato y SP en la conducción a nivel de médula espinal. La activación de receptores AMPA (α - amino-3-hidroxi-5metil-4-isoxazol de ácido propiónico) y NK-1 en el asta dorsal de la médula espinal, tal vez produce una actividad sináptica dependiente que incrementa la transcripción de una variedad de enzimas incluyendo COX-2 a nivel de médula espinal. Las reacciones de infamación periférica están asociadas con la injuria tisular y producen

la liberación de citoquinas proinflamatorias así como TNF- α e IL-1 β , lo cual puede realzar la transcripción de COX-2.¹ Un punto controversial es que la producción de IL-1 β que es liberada en la periferia se comprobó que no puede atravesar la barrera hematoencefálica por lo que la producción de IL-1 β a nivel del SNC es por síntesis de novo^{1,37}.

El efecto antihiperálgico de los AINES ha sido atribuido tradicionalmente a la inhibición de la formación de PGs en tejidos periféricos¹, sin embargo, datos de estudios en animales sugieren que la inhibición de PGs sintetizadas localmente, no explican completamente el espectro de eficacia de éstos fármacos. Diferentes estudios preclínicos han mostrado evidencias de que los AINEs tendrían un efecto a nivel de la médula espinal¹⁻³, produciendo inhibición de las COXs y uniéndose a otros tipos de receptores relacionados al dolor^{5,31,32}. Diclofenaco es un AINE que según estudios ha mostrado tener efectividad en enfermedades reumáticas y no reumáticas, la actividad analgésica y antiinflamatoria ha sido relacionado con la inhibición de síntesis de PGs¹⁹, además de otros estudios que han mostrado efecto antinociceptivo a nivel central^{2,30}. Así mismo, el paracetamol según Romundstad et al.⁴ presenta actividad antinociceptiva por inhibición de la óxido nítrico sintasa y acción sobre la actividad de serotonina a nivel del SNC⁴.

Además del empleo de los AINEs para el control del dolor, estos han sido sugeridos por varios estudios como neuroprotectores ante la toxicidad mediada por glutamato, reducen la incidencia de las enfermedades como Alzheimer y Parkinson¹³.

2.2.6 Ketorolaco

Es uno de los AINEs analgésicos más potentes disponibles para el uso clínico y experimental³. Este fármaco puede ser administrado oral, parenteral y tópicamente. Sus efectos son mayormente periféricos por la inhibición de COXs con la disminución de PGs, especialmente de PGE₂²⁶. Estudios en animales también sugieren que ketorolaco tendría un efecto analgésico modulador a nivel de SNC³ pues también se demostró que presenta actividad antipirética lo que sugiere su participación a nivel del SNC³⁸.

En humanos adultos ketorolaco ha sido extensamente evaluado en el alivio del dolor postoperatorio y otros estados de dolor agudo. Tiene eficacia analgésica similar a morfina y meperidina en el alivio del dolor postoperatorio y ha sido relacionado con pocos efectos adversos a nivel renal, gastrointestinal y la función plaquetaria en ratas neonatales. En pacientes con cólico renal y dolor músculo-esquelético, el ketorolaco redujo el dolor eficazmente al igual que los opiodes²⁶.

La eficacia analgésica del ketorolaco frente a los opiodes ha sido comprobada en cirugía de estrabismo, cirugía de próstata, tonsilectomía y cirugía dental²⁶.

2.2.7 Sumación temporal y espacial

Sumación temporal es un reflejo progresivo aumentado sobre las respuestas evocadas por las fibras c en neuronas del asta dorsal con estímulos repetitivos. Este fenómeno es potencialmente relevante en una variedad clínica del dolor dependiente del mecanismo de receptores de NMDA^{20,54,55}. Los neurotransmisores involucrados incluyen, neurotransmisores excitatorios y neuropéptidos como sustancia P, neurokinina A, lo cual produce la remoción de Mg^{2+} que esta bloqueando la activación de los receptores de NMDA en el asta dorsal de las neuronas de la médula espinal^{20,55,36}. La activación neuronal central conduce a la sumación temporal de respuestas neuronales repetitivas o entrada continua de nociceptores, la lenta sumación temporal representa una fase temprana de sensibilización central en la cual los receptores de glutamato incrementan el influjo de Ca^{2+} e inician la cascada intracelular de eventos bioquímicos²⁰.

La sumación temporal es desarrollada por la estimulación repetitiva de las fibras C^{20,55,36} y/o fibras delta pero no de fibras B, aunque esto sea controversial y existan estudios que describen sólo a la fibras C y algunos a las fibras C y delta simultáneamente.⁶¹

La sumación temporal esta asociada al fenómeno de wind-up, parecen ser dependientes ambos de la activación de los receptores de NMDA⁵⁵.

Las mujeres exhiben una mayor respuesta al estímulo térmico en sumación temporal comparado frente a los hombres, esta diferencia de percepción del dolor es múltiple, el cuál puede ser por causas biológicas (genéticas, psicológicas) y factores sociales aprendidos⁵⁹. Así mismo se determinó que las personas adultas presentan mayor respuesta dolorosa al estímulo térmico y esto podría ser por la disminución del sistema inhibitorio endógeno a nivel central o reducción de la plasticidad del SNC. Esto fue corroborado con el estudio de Bodnar et al., que evidenció en ratas la disminución progresiva del sistema modulador del dolor en sumación temporal.⁶⁰

La sumación temporal es atenuada por antagonistas de receptores de NMDA como ketamina y dextrometorfano⁶¹.

Sumación espacial, se denomina así al fenómeno por el cual se produce una sumación simultánea de los potenciales postsinápticos mediante la activación y descarga de muchas terminales nerviosas situadas en áreas muy separadas. Los impulsos resultantes proveniente de los estímulos llegan a través de distintas neuronas de

acuerdo al área estimulada, mientras mayor área anatómica sea expuesta frente a un estímulo (químico, térmico, mecánico) mayor descarga de neurotransmisores se producirá a nivel del asta dorsal a nivel de la médula espinal y se producirá una mayor liberación de glutamato, sustancia P y otros neurotransmisores^{51, 53,54}.

Al producirse la sumación espacial por la activación de varias terminales nerviosas y la consecuente activación a nivel central se desarrollará luego la activación de los receptores de NMDA principalmente por el neurotransmisor glutamato²⁴.

Desde un punto de vista clínico, los desordenes musculoesqueléticos, envuelven un gran número de fibras aferentes y neuronas centrales por lo que se cree tiene evidencias de que la sumación espacial tal vez sea importante para el proceso de la información nociceptiva⁵².

El mecanismo inhibitorio descendente así como el control inhibitorio descendente nocivo ha sido sugerido como un potente mecanismo de alivio del dolor que es producto de la sumación espacial⁵².

Tanto la sumación espacial y temporal pueden ser originados por estímulos químicos, térmicos y mecánicos, así mismo las respuestas producto de la sumación espacial y temporal pueden variar por diferentes factores, estados de ansiedad, sexo, edad condición social y patrones de conducta desarrollados⁵⁹.

2.3 Definición de términos

Ketorolaco

Antiinflamatorio no esteroideo (AINE) de acción analgésica potente y moderada actividad antiinflamatoria, usado mayormente para el manejo del dolor postoperatorio (Sotgiu et al., 1998)³.

Memantina

Antagonista no competitivo de receptores de NMDA que interfiere reflejos nociceptivos somáticos y viscerales. (Olivar et al., 2000)²².

Sumación espacial

Fenómeno por el cual se produce una sumación simultánea en la liberación de neurotransmisores a nivel de la médula espinal por la estimulación de creciente varias terminales nerviosas por un agente inductor químico (ácido sulfúrico) (Guía de prácticas de fisiología de la facultad de medicina de la UNMSM 2006⁵⁴ y Ge et al., 2003⁵²).

Sumación temporal

Liberación del número de neurotransmisores por una misma terminal nerviosa a nivel de la médula espinal, al inducirse la terminal nerviosa a concentraciones crecientes del agente inductor (ácido sulfúrico) (Guía de prácticas de fisiología de la Facultad de Medicina de la UNMSM 2006⁵⁴ y Staud et al., 2005²⁰).

Dolor

Constante que acompaña a la mayoría de procedimientos quirúrgicos. Es una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con daño, real o potencial, a los tejidos. (International Association for the Study of Pain; IASP)⁵².

III. Material y métodos

3.1. Métodos

3.1.1. Tipo de estudio

Experimental, transversal y prospectivo.

3.1.2. Población y muestra

3.1.3. Universo

El universo del presente trabajo de investigación estuvo conformado por sapos de la especie ***Bufos vulgaris*** provenientes de Chiclayo.

3.1.4. Tipo de muestreo

El tipo de muestreo fue aleatorio

3.1.5. Muestra

De acuerdo a investigaciones anteriores, al trabajo experimental preliminar y el control del error tipo α con un margen de 95% de confiabilidad, la muestra que se determinó fue de:

- ❖ 90 sapos para la validación del modelo experimental de dolor agudo en sumación temporal y espacial.
- ❖ 30 sapos para la comparación de la actividad del ketorolaco con un antagonista no competitivo de receptores de NMDA utilizando el modelo experimental de sumación temporal y espacial.
- ❖ 20 sapos para evaluar la actividad electromiográfica del músculo semimembranoso.

Ampollas de ketorolaco (Hanalgeze® 60mg/2ml), comprimidos de memantina (Eutebrol® 10mg), ampollas de suero fisiológico y ampollas de agua destilada fueron administrados en el saco linfático del sapo espinal para evaluar dolor agudo en sumación temporal y espacial. Para la administración de los fármacos, en el saco linfático de los sapos, se empleo jeringas descartables de 1 y 5 cc.

Para el registro de la actividad electromiográfica se empleo el electromiógrafo MIOBACK ND-35 ®.

Cada elemento muestral debió cumplir los criterios de inclusión y exclusión que fueron requeridos para el presente trabajo de investigación.

3.1.6. Unidad de muestra

Estuvo conformada por un sapo espinal.

3.1.7. Criterios de inclusión de los elementos muestrales

- El promedio de los pesos de los sapos fue de 100g y no difirió en más de 10g.
- La edad de los sapos estuvo comprendido entre los 4 y 5 meses

3.1.8. Criterios de exclusión de los elementos muestrales

- Sapos que después de la preparación espinal aún presentaron movimientos espontáneos de los miembros inferiores y superiores.
- Sapos que presentaron una hemorragia excesiva después de la preparación espinal

3.2. Procedimientos

3.2.1. Aspectos éticos sobre el manejo de animales de experimentación

El trabajo de investigación respetó las normas internacionales vigentes del manejo ético de animales de experimentación durante todo el desarrollo del trabajo de investigación.²³

3.2.2. Validación del método experimental de sumación temporal y espacial en sapos espinales como modelo de dolor agudo.

Se seleccionaron 90 sapos de la especie *Bufo vulgaris* con una edad promedio de 4 a 5 meses, y con un peso de $100 \pm 5g$, los animales fueron mantenidos en un ambiente ventilado, en jaulas metálicas de 4 sapos por jaula. La alimentación y el agua fueron a libre demanda por un período de 3 días previos a las pruebas experimentales. A todos los sapos se les realizó la preparación espinal.

Método para la preparación del sapo espinal⁵³

En un sapo a la altura del conducto auditivo externo (CAE) se identificó el surco que delimita, por la parte dorsal externa, la médula del encéfalo (primer surco formado al presionar la parte dorsal del sapo y levantar la cabeza) luego con un estilete se destruyó la porción encefálica dejando intacta sólo la médula, a esto se le denominó sapo espinal o preparación espinal (Fig. 1). Después se colocó una torunda de algodón para evitar la salida excesiva de sangre y Líquido céfalo raquídeo (LCR) en el lugar por donde se introdujo el estilete.



Figura 1. Preparación de sapo espinal con un estilete

Al destruirse la porción encefálica se interrumpe la vía de los fascículos ascendentes del sapo por lo que este no sentirá dolor, solo presentará respuestas reflejas ante cualquier estímulo, arco reflejo a nivel de médula espinal, en estas condiciones el sapo se suspende en un soporte vertical prefabricado (Fig. 2) por medio de una aguja de sutura, el cual esta fijo en el soporte vertical, colocado en la boca (maxilar inferior).



Figura 2. Parante o soporte para fijar el sapo espinal.

Una vez que se obtuvo la preparación sapos espinales, los animales fueron expuestos a ácido sulfúrico según el grupo asignado aleatoriamente, para evaluar el dolor agudo: a) grupo de Sumación Temporal y b) grupo de Sumación Espacial.

a. Sumación Temporal para evaluar el dolor agudo en sapos espinales⁵³

Se denomina sumación temporal al fenómeno por el cual al ir aumentando la intensidad del estímulo periférico en los nociceptores se descargan en el asta posterior de la médula espinal un mayor número de neurotransmisores (glutamato).

Los potenciales posinápticos sucesivos son originados por descargas de una sola terminal presináptica, si se producen con la rapidez suficiente, pueden sumarse los potenciales posinápticos procedentes de terminales muy esparcidas por la superficie de la neurona, la rapidez suficiente ocurre cada vez que se estimula las terminaciones nerviosas con un estímulo cada vez creciente.

50 sapos espinales fueron divididos en 5 grupos de 10 sapos cada uno, los cuales fueron sometidos para la evaluación de dolor agudo en sumación temporal en sapos espinales de la siguiente manera:

Grupo 1. 10 sapos a los cuales se les introdujo el tercio distal del dedo largo de la pata trasera izquierda en una solución de suero fisiológico.

Grupo 2. 10 sapos a los cuales se les introdujo el tercio distal del dedo largo de la pata trasera izquierda en una solución de ácido sulfúrico al 0.1%.

Grupo 3. 10 sapos a los cuales se les introdujo el tercio distal del dedo largo de la pata trasera izquierda en una solución de ácido sulfúrico al 0.3%.

Grupo 4. 10 sapos a los cuales se les introdujo el tercio distal del dedo largo de la pata trasera izquierda en una solución de ácido sulfúrico al 0.5%.

Grupo 5. 10 sapos a los cuales se les introdujo el tercio distal del dedo largo de la pata trasera izquierda en una solución de ácido sulfúrico al 1%.

a.1 Pasos para la evaluación del dolor agudo en Sumación Temporal

1. Preparación del sapo espinal (Fig. 1)
2. Se colgó al animal en un soporte (Fig. 3)
3. Se introdujo el tercio distal del dedo largo de la pata del sapo espinal a una (Fig. 4) solución de agua destilada y a concentraciones crecientes de ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 0.1, 0.3, 0.5 y 1% (Fig. 5)
4. Entre estímulos al aumentar la concentración del ácido sulfúrico (0.1%, 0.3%, 0.5 y 1%) se procedió a lavar la pata del sapo con suero fisiológico.
5. El tiempo de contacto de la piel de la pata trasera del sapo espinal fue de 1 segundo (Fig. 6)

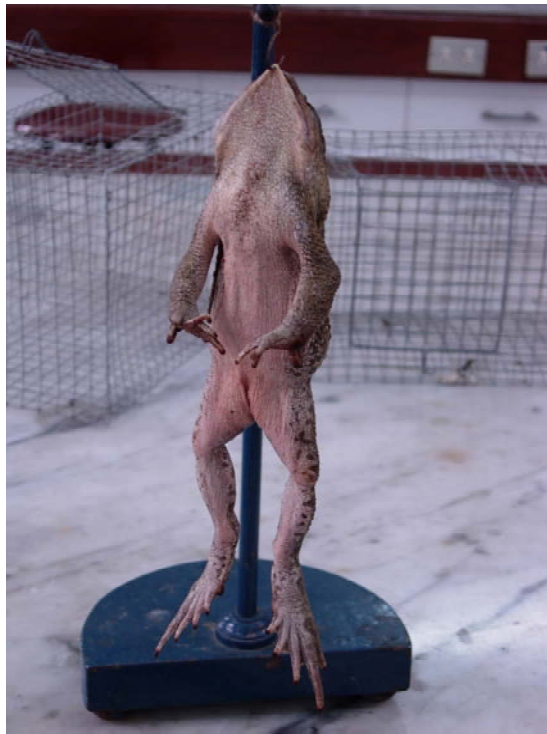


Figura 3. Sapo suspendido en un soporte después de la preparación espinal



Tercio distal del dedo largo

Figura 4. Tercio distal del dedo largo de la pata izquierda del sapo

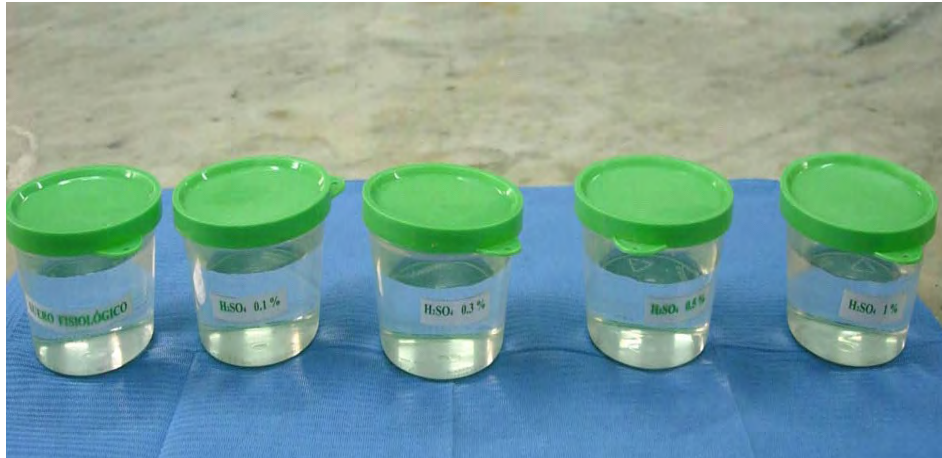


Figura 5. Concentraciones diferentes de ácido sulfúrico 0.1%, 0.3%, 0.5 y 1%.



Figura 6. Exposición de la pata del sapo espinal con ácido sulfúrico por 1 segundo

6. Cuando el sapo espinal, frente al estímulo químico (H_2SO_4) retiró la pata del recipiente que contenía el ácido a diferentes concentraciones se denominó reflejo de retirada de la pata y que prosigue con más reflejos (contracciones musculares) que se evaluaron por 1 minuto (Fig. 7 y 8).

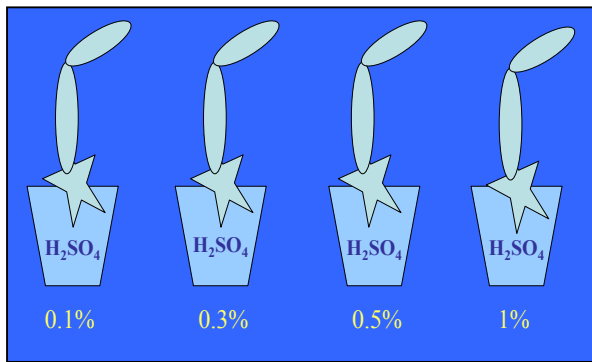


Figura 7.- Sumación Temporal

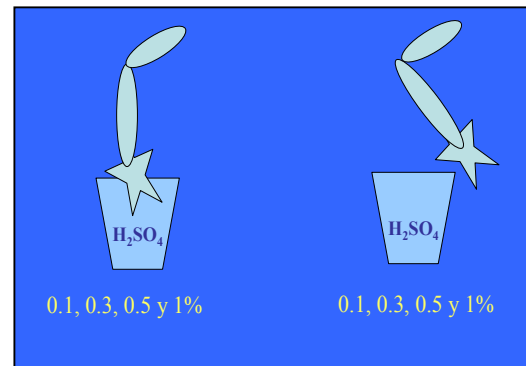


Figura 8.- Reflejo de retirada de la pata

La unidad de medición del dolor agudo, que se evaluó en sumación temporal en sapos espinales, fue el reflejo de retirada de la pata (expresado en número de contracciones musculares). Lo que evaluó **el reflejo de retirada de la pata** (reflejo involuntario) es el arco reflejo que se produce a nivel medular, que esta mediado por la activación de receptores de NMDA por glutamato (Cull-Candy et al., 2001)²⁴ (liberado por la neurona sensitiva primaria) en el asta dorsal de la médula espinal y que al activar los receptores de NMDA producirán a un potencial postsináptico excitatorio en las motoneuronas del asta ventral de la médula espinal que a su vez producirán en la placa motora terminal liberación de acetilcolina que al unirse a receptores nicotínicos N_M producirá despolarización por ingreso de sodio en el músculo estriado que a su vez provocará liberación de calcio intracelular para la activación de las fibras de actina y miosina que se traduce finalmente como contracción muscular.

El primer movimiento y los subsiguientes que realizó el sapo espinal al retirar la pata del agente inductor (H_2SO_4) se denominó reflejo de retirada de la pata que se evaluó por el número de contracciones en un minuto.

b. Sumación Espacial para evaluar el dolor agudo en sapos espinales⁵³

Se denomina Sumación Espacial al fenómeno por el cual se produce una sumación simultánea de los potenciales posinápticos mediante la activación o descarga de muchas terminales situadas en áreas muy separadas de la membrana celular. Los impulsos resultantes proveniente de los estímulos llegan a través de distintas neuronas de acuerdo al área estimulada de la piel del sapo con ácido sulfúrico, mientras mayor área sea expuesta mayor descarga de neurotransmisores se producirá a nivel del asta dorsal de la médula espinal y se producirá la liberación de glutamato, neuropeptidos y de otros neurotransmisores.

40 sapos espinales fueron divididos en 4 grupos de 10 sapos cada uno, los cuales fueron sometidos para la evaluación de dolor agudo en Sumación Espacial en sapos espinales de la siguiente manera:

Grupo 1. 10 sapos a los cuales se les introdujo el tercio distal del dedo largo, la totalidad del dedo largo y la totalidad de la pata trasera izquierda en una solución de suero fisiológico.

Grupo 2. 10 sapos a los cuales se les introdujo el tercio distal del dedo largo de la pata trasera izquierda en una solución de ácido sulfúrico al 0.3%.

Grupo 3. 10 sapos a los cuales se les introdujo la totalidad del dedo largo de la pata trasera izquierda en una solución de ácido sulfúrico al 0.3%.

Grupo 4. 10 sapos a los cuales se les introdujo la totalidad de la pata trasera de la pata trasera izquierda en una solución de ácido sulfúrico al 0.3%.

b.1 Pasos para la evaluación del dolor agudo en Sumación Espacial

1. Se realizó la preparación del sapo espinal (Fig. 1)
2. Se colgaron los sapos espinales en un soporte debidamente prefabricado (Fig. 3)
3. Se expuso la piel de la pata trasera del sapo de la siguiente manera: en un primer momento el tercio distal del dedo medio, luego la totalidad del dedo largo y al final la totalidad de la pata que incluía todos los dedos de la pata del sapo (Fig. 10).
4. Se Introdujeron la partes de la pata del sapo previamente establecido en una solución de 0.3% de Ácido sulfúrico por 1 segundo.
5. Se lavó con suero fisiológico la pata trasera del sapo cada vez que se introducía la pata y se aumentaba el área de contacto con el ácido sulfúrico
6. El tiempo que estuvo en contacto la piel de la pata del sapo fue de 1 segundo.
7. Cuando el sapo espinal frente al estímulo químico retiró la pata del frasco que contenía el ácido sulfúrico fue denominado como “reflejo de retirada de la pata” y posterior a este reflejo se originan más reflejos (contracciones musculares) que se evaluaron durante 1 minuto (Fig. 11 y 12).



Figura 10.- Partes de la pata del sapo espinal para la exposición con ácido sulfúrico

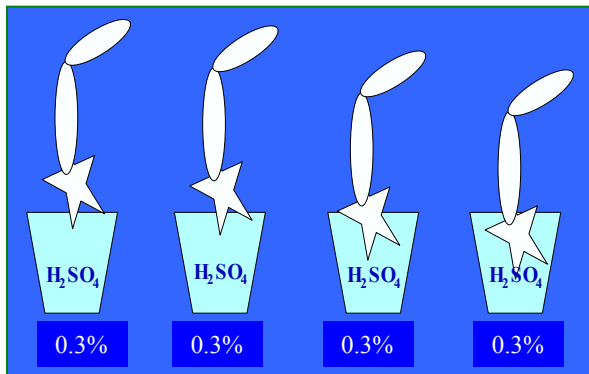


Figura 11.- Sumación espacial

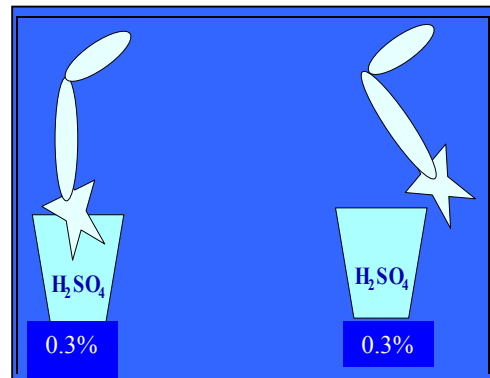


Figura 12.- Reflejo de retirada de la pata

La unidad de medición del dolor agudo, que se evaluó en sumación espacial en sapos espinales, fue el reflejo de retirada de la pata (expresado en número de contracciones musculares). Lo que evaluó **el reflejo de retirada de la pata** (reflejo involuntario) es el arco reflejo que se produce a nivel medular, que esta mediado por la activación de receptores de NMDA por glutamato (Cull-Candy et al., 2001) ²⁴.

El primer movimiento y los subsiguientes que realizó el sapo espinal al retirar la pata del agente inductor (H_2SO_4) se denominó reflejo de retirada de la pata que se evaluó por el número de contracciones en un minuto.

3.2.3. Actividad del ketorolaco frente a un antagonista no competitivo de receptores de NMDA utilizando el modelo experimental de sumación temporal y espacial.

La actividad de ketorolaco se comparó frente a un antagonista no competitivo de receptores de NMDA (control positivo) y a una solución salina fisiológica (control negativo) en el modelo de sumación espacial y temporal en sapos espinales.

La preparación del sapo espinal se realizó de acuerdo a la técnica mencionada en la validación del método para la evaluación de dolor agudo en sumación temporal y espacial.

Los fármacos (ketorolaco, memantina y suero fisiológico) fueron administrados en el saco linfático de los sapos espinales de acuerdo al método que se detalla a continuación.

Método para la administración de los fármacos en el saco linfático⁵³

Para la administración de los fármacos se tomó al sapo por la parte dorsal, luego a la altura de la articulación isquiofemoral se introdujo la aguja (25G) en el saco linfático de forma paralela a la columna vertebral, se aspiró para comprobar que no se estaba en un vaso sanguíneo y se le administró lentamente los fármacos según el grupo al cual pertenecían (Fig. 13).

Los fármacos fueron administrados en el saco linfático del sapo (que es equivalente a una administración Intravenosa). La administración del fármaco se realizó después de que se realizó la preparación del sapo espinal. Ketorolaco fue administrado en solución (Hanalgeze® 60mg/2ml); la memantina (Eutebrol® 10mg) se diluyó en agua destilada, 5 comprimidos de 10 mg en 10ml.



Figura 13.- Administración de los fármacos en el saco linfático del sapo espinal.

La cantidad máxima de volumen que se administró en el saco linfático del sapo no fue mayor a 0.5ml en cada saco linfático (derecho e izquierdo).

La población que se determinó para comparar la actividad del ketorolaco con un antagonista no competitivo de receptores de NMDA y el control negativo fue de 30 sapos que se distribuyeron en 3 grupos de 10 sapos cada uno y la distribución se realizó de la siguiente manera:

❖ **GRUPO I**

10 Sapos a los cuales se les administró suero fisiológico. Una dosis de 2ml/kg en el saco linfático.

❖ **GRUPO II**

10 Sapos a los cuales se les administró ketorolaco (Hanalgeze® 60mg/2ml) (Fig. 14) una dosis de 120 mg/kg en el saco linfático.

❖ **GRUPO III**

10 Sapos a los cuales se les administró memantina (Eutebrol® 10 mg) (Fig. 15) una dosis de 50 mg/kg en el saco linfático.

Una vez administrado los fármacos en los sapos espinales (ketorolaco, memantina y suero fisiológico) se les realizó las pruebas de dolor agudo en sumación espacial y temporal.



Figura 14. Ketorolaco de 60 mg (Hanalgeze®)



Figura 15. Memantina de 10 mg (Eutebrol®)

En sumación espacial se indujo el reflejo de retirada de la pata trasera del sapo espinal (derecha e izquierda) al inducirse con 0.3% de ácido sulfúrico diferentes áreas anatómicas de la piel de la pata del sapo; el tercio distal del dedo largo, la totalidad del

dedo largo y la totalidad de la pata del sapo espinal. La unidad de medida fue el reflejo de retirada de la pata en contracciones musculares.

En sumación temporal se expuso el tercio distal del dedo largo de la pata trasera de los sapos espinales a diferentes concentraciones de ácido sulfúrico (0.1, 0.3, 0.5 y 1%) en los diferentes grupos. La unidad de medida que se registró fue el reflejo de retirada de la pata en contracciones musculares.

3.2.4. Actividad electromiográfica del músculo semimembranoso.

Para la evaluación de la actividad electromiográfica del músculo semimembranoso se realizó la exposición de dicho músculo tras cortar la piel de la parte dorsal del muslo del sapo espinal, una vez que se expuso el músculo semimembranoso (principal músculo flexor) se procedió a la colocación de los electrodos de aguja en el músculo y un electrodo en forma de disco a nivel dorsal en el sapo espinal.

20 sapos espinales fueron divididos en 2 grupos de 10 sapos cada uno, los cuales fueron sometidos para la evaluación de la actividad electromiográfica del músculo semimembranoso, al exponerse el tercio distal del dedo largo de la pata trasera izquierda de los sapos espinales a concentraciones de 0.5 y 1% de ácido sulfúrico.

Grupo A. 10 sapos a los cuales se les administró suero fisiológico y luego se les introdujo el tercio distal del dedo largo a una solución de ácido sulfúrico al 0.5% para obtener un electromiograma de la actividad muscular del semimembranoso, luego a estos mismos sapos se les administró 120mg/Kg de ketorolaco en el saco linfático y se introdujo nuevamente el tercio distal del dedo largo en el ácido sulfúrico al 0.5% para obtener un electromiograma de la actividad del músculo semimembranoso tras la administración de ketorolaco.

Grupo B. 10 sapos a los cuales se les administró suero fisiológico y luego se les introdujo el tercio distal del dedo largo a una solución de ácido sulfúrico al 1% para obtener un electromiograma de la actividad muscular del semimembranoso, luego a estos mismos sapos se les administró 120mg/Kg de ketorolaco en el saco linfático y se introdujo nuevamente el tercio distal del dedo largo en el ácido sulfúrico al 1% para obtener un electromiograma de la actividad del músculo semimembranoso tras la administración de ketorolaco.

La electromiografía (EMG) permitió examinar parámetros bioeléctricos específicos, relacionados con la electrofisiología del músculo semimembranoso se registraron las ondas de despolarización de las fibras musculares y los aspectos que se midió de la unidad motora fueron; su amplitud, duración y forma de la onda⁶².

3.3.5 Tratamiento estadístico.

El análisis estadístico fue realizado empleando el software SPSS® versión 14.0 para Windows.

Se realizaron análisis estadísticos descriptivos y pruebas de significancia Kruskal Wallis y la Prueba U de Mann Withney.

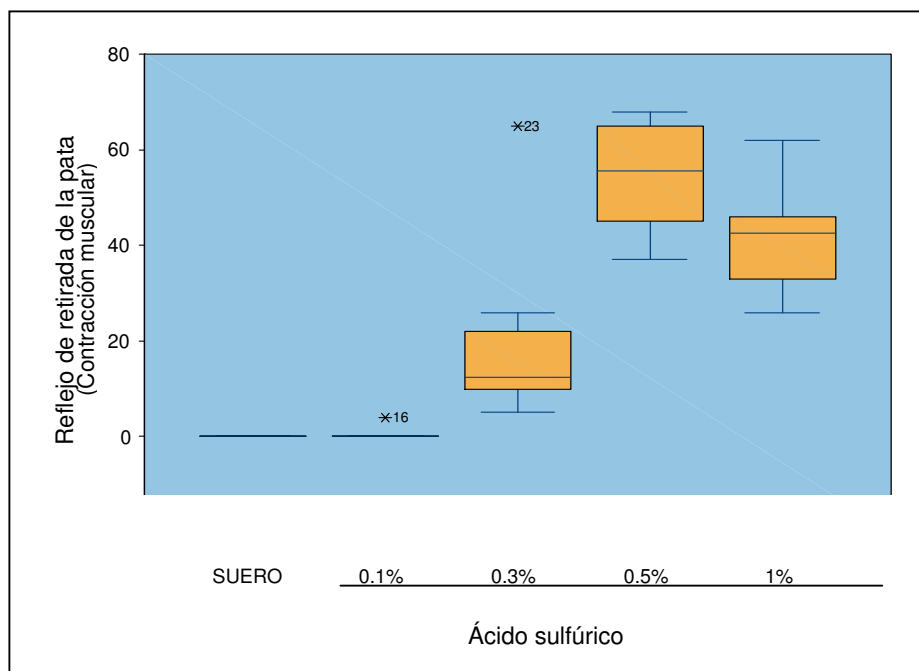
IV. Resultados

Se realizó análisis descriptivo y pruebas de significancia estadística para:

4.1. Validación del diseño experimental de dolor agudo empleando el modelo de sumación temporal y espacial en sapos espinales

4.1.a. Validación del diseño experimental de dolor agudo empleando el modelo de sumación temporal en sapos espinales

Gráfico 1. Reflejo de retirada de la pata izquierda de los sapos espinales en sumación temporal al exponerse el tercio distal del dedo largo de la pata del sapo.



Las medianas de la respuesta de reflejo de retirada de la pata al estimular con suero, y H_2SO_4 al 0.1 % fue nulo. Se encontró respuesta al estimular con H_2SO_4 al 0.3%, 0.5% y 1%. Las medianas de la respuesta del reflejo de retirada de la pata aumentó al incrementar la concentración del H_2SO_4 de 0.3% a 0.5%, sin embargo hubo una mayor dispersión en la respuesta al estimular con H_2SO_4 al 0.5% en relación a 0.3%. de H_2SO_4 . Al estimular con H_2SO_4 al 1% la mediana de la respuesta de retirada fue menor y con menor dispersión que al estimular con H_2SO_4 al 0.5%.

Tabla 1. Reflejo de retirada de la pata izquierda del sapo espinal en sumación temporal al ser expuesto el tercio distal del dedo largo de la pata del sapo a diferentes concentraciones de H₂SO₄.

Superficie anatómica expuesta	Suero Fisiológico (n=10)	Acido sulfúrico 0,1% (n=10)	Acido sulfúrico 0,3% (n=10)	Acido sulfúrico 0,5% (n=10)	Acido sulfúrico 1% (n=10)
Tercio distal del dedo largo de la pata del sapo	0	0	12	45	56
	0	0	26	68	62
	0	0	65	50	46
	0	0	13	57	26
	0	0	9	37	43
	0	4	11	42	42
	0	0	10	54	43
	0	0	5	67	40
	0	0	22	63	33
	0	0	21	65	32
Promedio	0	0,4	19,4	54,8	42,3

Gráfico 2. Comparación del promedio del reflejo de retirada de la pata izquierda del sapo en sumación temporal entre el grupo control y los grupos de estudio al ser expuesto el tercio distal del dedo largo de la pata de los sapos espinales.

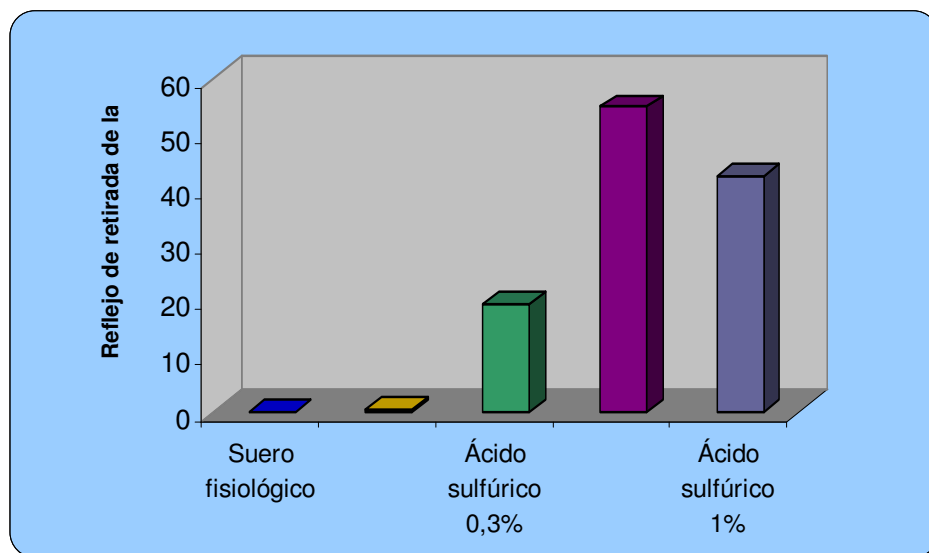
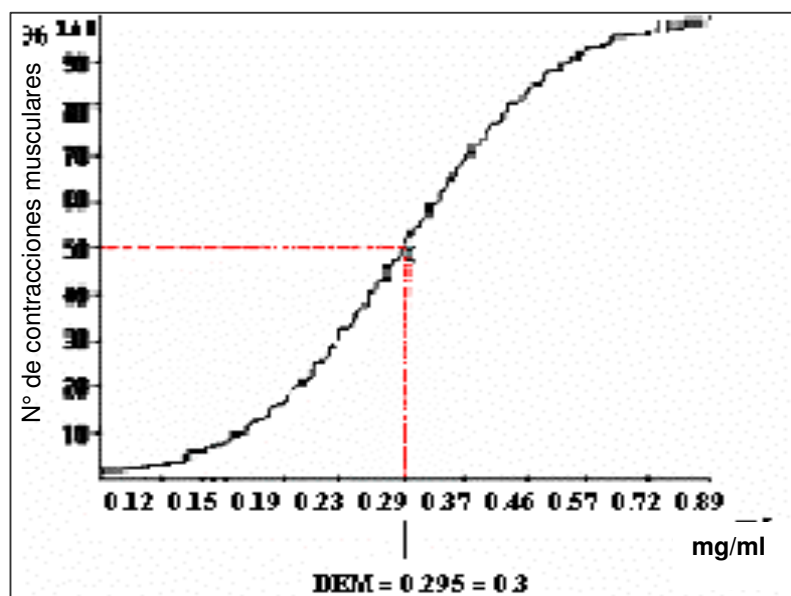


Gráfico 3. Concentración efectiva media de ácido sulfúrico para producir 50% del reflejo de retirada de la pata en sapos espinales en sumación temporal.



De la tabla 1, gráfico 2 el mayor promedio del reflejo de retirada de la pata al estimularse con diferentes concentraciones de H_2SO_4 se encontró con 0.5% de H_2SO_4 , siendo mayor incluso al de 1% de H_2SO_4 . El menor promedio del reflejo de retirada de la pata izquierda del sapo se obtuvo con la concentración de 0.1% de H_2SO_4 casi similar al grupo control.

Del gráfico 3, la concentración efectiva media de ácido sulfúrico que produjo un 50% del reflejo total de retirada de la pata izquierda de los sapos espinales fue la concentración de 0,3% de H_2SO_4 al exponerse el tercio distal del dedo largo (TDDL) según el modelo experimental de dolor agudo en sumación temporal.

Se encontró diferencia estadística significativa del grupo que fue expuesto a 0.3% H_2SO_4 frente al grupo de suero fisiológico. ($p < 0,000$ según la prueba U Mann Whitney).

4.1.b. Validación del diseño experimental de dolor agudo empleando el modelo de sumación espacial en sapos espinales

Tabla 2. Cuadro comparativo del reflejo de retirada de la pata izquierda de los sapos espinales en sumación espacial al ser inducidas con 0.3% de ácido sulfúrico las diferentes áreas anatómicas.

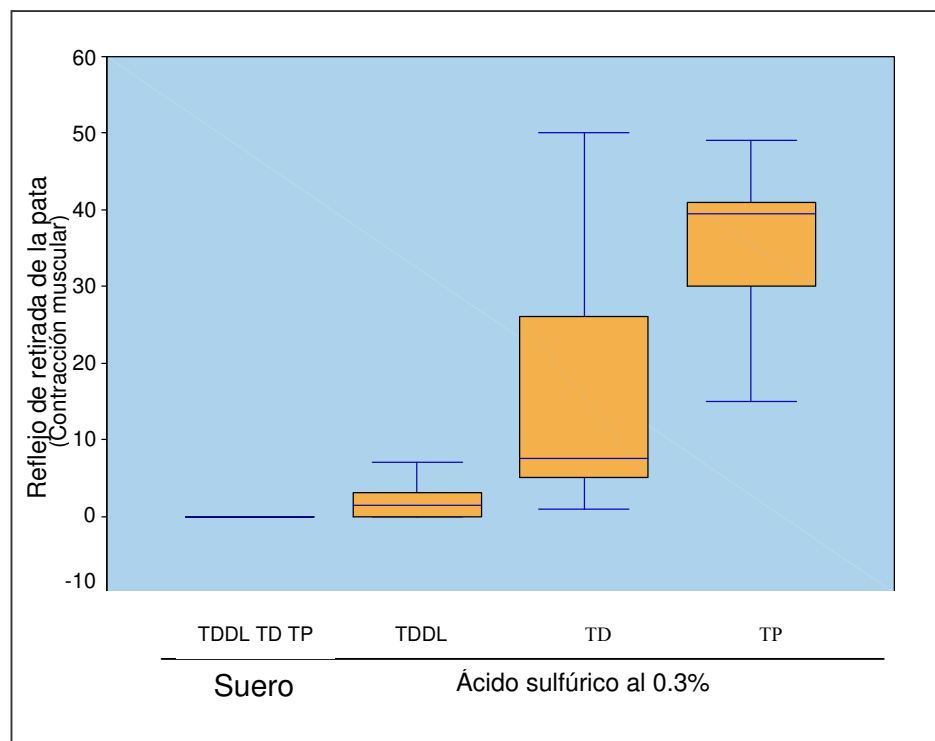
Reflejo de retirada	TDDL SUERO FISIOLÓGICO (n=10)	TDL SUERO FISIOLÓGICO (n=10)	TP SUERO FISIOLÓGICO (n=10)	TDDL ACIDO SULFÚRICO 0,3% (n=10)	TDL ACIDO SULFÚRICO 0,3% (n=10)	TP ACIDO SULFÚRICO 0,3% (n=10)
Número de reflejo de retirada de la pata	0	0	0	3	50	30
	0	0	0	3	11	30
	0	0	0	2	5	40
	0	0	0	1	1	39
	0	0	0	0	5	32
	0	0	0	1	8	43
	0	0	0	7	38	49
	0	0	0	0	7	15
	0	0	0	2	5	41
	0	0	0	0	26	40
Promedio	0	0	0	1,9	15,6	35,9

TDDL : Tercio distal del dedo largo de la pata del sapo

TDL : Totalidad del dedo largo de la pata del sapo

TP : Totalidad de la pata del sapo

Gráfico 4. Comparación del reflejo de retirada de la pata izquierda de los sapos espinales en sumación espacial entre el grupo control y los que fueron expuestos a 0.3% de ácido sulfúrico



De la tabla 2 y gráfico 4, al exponerse a 0,3% de ácido sulfúrico (concentración efectiva media) la superficie anatómica del tercio distal del dedo largo (TDDL) de la pata izquierda del sapo se observa inicio del reflejo de retirada de la pata.

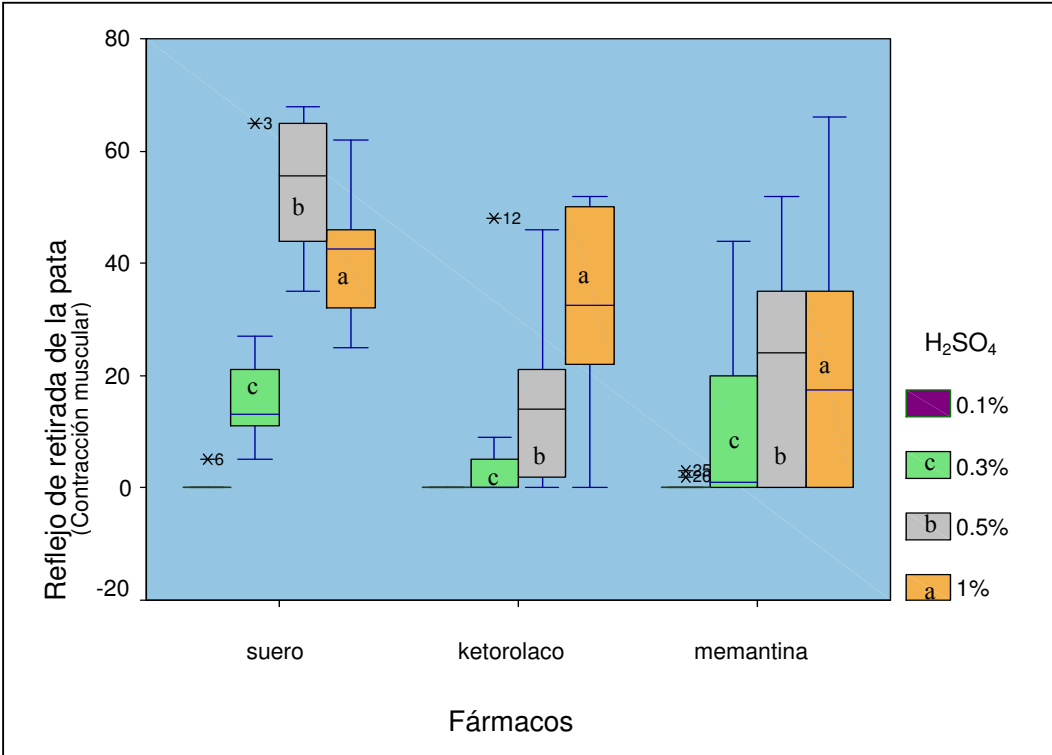
Del gráfico 4 al estimularse mayores áreas anatómicas de la pata izquierda del sapo se obtienen mayores respuestas del reflejo de retirada de la pata pero presentan así mismo una mayor dispersión entre los rangos intercuartílicos. El TDDL de la pata del sapo al exponerse a 0.3% de H_2SO_4 presentó una menor dispersión del rango intercuartílico. No se encontraron valores extremos en ninguno de los grupos de estudio.

Se encontró diferencia estadística significativa del grupo al cuál se le expuso el tercio distal del dedo largo de la pata izquierda del sapo a 0.3% frente al grupo de suero fisiológico. ($p < 0,002$, Según la prueba U Mann Whitney).

4.2. Determinación de la acción analgésica de ketorolaco empleando el modelo experimental de dolor agudo en sumación temporal y espacial.

4.2.a. Reflejo de retirada de la pata izquierda del sapo espinal luego de administrarse ketorolaco, memantina y suero fisiológico, utilizando el modelo experimental de dolor agudo de sumación temporal en sapos espinales

Gráfico 5. Comparación del reflejo de retirada de la pata izquierda del sapo luego de administrarse ketorolaco, memantina y suero fisiológico, utilizando el modelo experimental de dolor agudo en sumación temporal en sapos espinales



La mediana de la respuesta del reflejo de retirada de la pata izquierda al estimular con 0.1% de H₂SO₄ fue nulo. Se encontró respuesta del reflejo de retirada de la pata al estimular con las concentraciones de 0.3%, 0.5% y 1% de H₂SO₄.

Los sapos a quienes se les administró ketorolaco presentaron menor reflejo de retirada de la pata y menor dispersión del rango intercuartílico al estimularse con 0.3% de H₂SO₄ en relación a los grupos de suero fisiológico y memantina.

Los sapos a quienes se les administró memantina presentaron menor reflejo de retirada de la pata al estimularse con 1% de H₂SO₄ en relación al resto de grupos.

En general se encontraron escasos valores extremos y una mayor dispersión de los datos en el grupo a quien se les administró memantina.

Se encontró diferencia estadística significativa entre los grupos al exponerse el tercio distal del dedo largo de la pata izquierda del sapo espinal a concentraciones de 0.3% y 0.5% de H₂SO₄ (Según la prueba Kruskal Wallis $p < 0,008$ y $p < 0,000$ respectivamente).

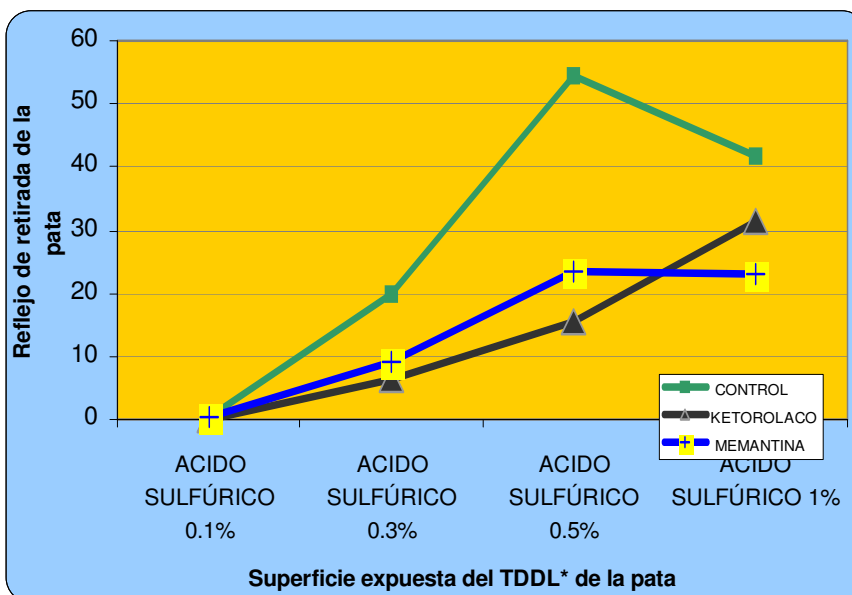
Tabla 3. Cuadro comparativo del reflejo de retirada de la pata izquierda de los sapos espinales en sumación temporal luego de administrarse ketorolaco, memantina y suero fisiológico

Estímulo químico	Promedio del reflejo de retirada del TDDL* de la pata izquierda		
	Control	Ketorolaco	Memantina
Ácido sulfúrico 0.1%	0,5 ± 1,58	0	0,5 ± 1,08
Ácido sulfúrico 0.3%	19,7 ± 17,21	6,2 ± 15,00	9,3 ± 15,12
Ácido sulfúrico 0.5%	54,4 ± 11,44	15,3 ± 14,80	23,4 ± 18,63
Ácido sulfúrico 1%	41,9 ± 11,31	31,5 ± 16,74	23,1 ± 23,94

Valores expresados en media y desviación estándar

*TDDL: Tercio distal del dedo largo de la pata del sapo

Gráfico 6. Reflejo de retirada de la pata izquierda de los sapos espinales en sumación temporal luego de administrarse ketorolaco, memantina y suero fisiológico.



*TDDL: Tercio distal del dedo largo

De la tabla 3 y gráfico 6, ketorolaco produjo menor número de reflejos de retirada de la pata izquierda del sapo en sumación temporal en relación al grupo control al exponerse a diferentes concentraciones de ácido sulfúrico. La memantina produjo menor reflejo de retirada de la pata izquierda al exponerse 1% de ácido sulfúrico en relación al grupo control y ketorolaco.

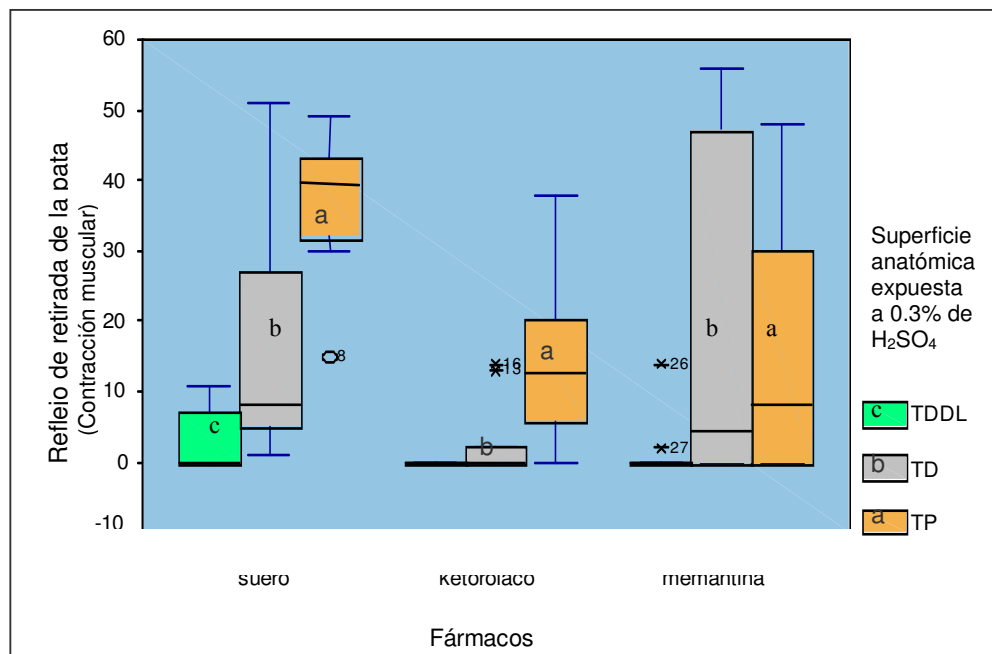
Se encontró diferencia estadística significativa entre los grupos ketorolaco frente al control; entre memantina y el grupo control al exponerse 0.3% de H_2SO_4 (Según la prueba U Mann Whitney $p<0,003$ y $p<0,040$ respectivamente).

Se encontró diferencia estadística significativa entre los grupos de ketorolaco frente al control; entre memantina y el grupo control al exponerse 0.5% de H_2SO_4 (Según la prueba U Mann Whitney $p<0,000$ y $p<0,001$ respectivamente)

Se encontró diferencia estadística significativa entre el grupo de memantina y el grupo control al exponerse 1% de H_2SO_4 el TDDL de la pata del sapo espinal (según la prueba U Mann Whitney $p<0,049$).

4.2.b. Reflejo de retirada de la pata izquierda del sapo espinal luego de administrarse ketorolaco, memantina y suero fisiológico, utilizando el modelo experimental de dolor agudo de sumación espacial en sapos espinales

Gráfico 7. Comparación de la respuesta del reflejo de retirada de la pata entre ketorolaco, memantina y suero fisiológico utilizando el modelo en experimental de sumación espacial en sapos espinales



TDDL : Tercio distal del dedo largo de la pata del sapo
 TDL : Totalidad del dedo largo de la pata del sapo
 TP : Totalidad de la pata del sapo

Los sapos a quienes se les administró suero fisiológico fueron los únicos en presentar reflejo de retirada de la pata izquierda al exponerse 0.3 % de H₂SO₄.

El grupo de ketorolaco presentó una menor mediana y menor dispersión del reflejo de retirada de la pata izquierda en relación a los otros grupos al exponerse la totalidad del dedo largo de la pata del sapo a 0.3% de H₂SO₄.

El grupo de ketorolaco y memantina produjeron menor reflejo de retirada de la pata izquierda en relación al grupo control al exponerse la totalidad de la pata a 0.3% de H₂SO₄, siendo el grupo de memantina el que presentó menor reflejo de retirada, pero con una mayor dispersión con respecto al grupo de ketorolaco

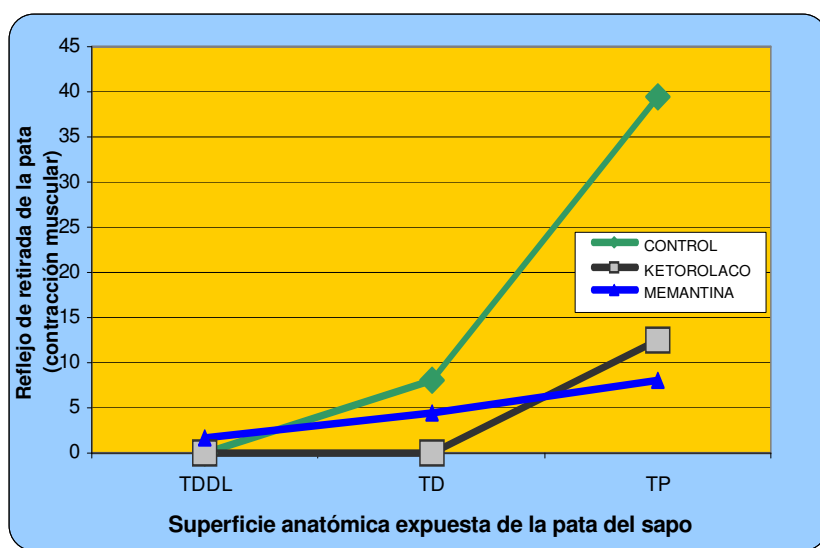
Se encontró diferencia estadística significativa entre los grupos al exponerse la totalidad del dedo y la totalidad de la pata de los sapos espinales a 0.3% de H₂SO₄ (Según la prueba Kruskal Wallis p<0,046 y p<0,006 respectivamente)

Tabla 4. Cuadro comparativo de las medianas del reflejo de retirada de la pata izquierda de los sapos espinales en sumación espacial entre los grupos control y de estudio

Área anatómica estimulada por ácido sulfúrico 0,3%	Medianas del reflejo de retirada de la pata izquierda		
	Control	Ketorolaco	Memantina
Tercio distal del dedo largo	$0 \pm 4,17$	0	$1,6 \pm 4,40$
Totalidad del dedo largo	$8 \pm 17,06$	$0 \pm 5,63$	$4,5 \pm 24,49$
Totalidad de la pata	$39,5 \pm 9,55$	$12,5 \pm 11,59$	$8 \pm 19,34$

Valores expresado en mediana y desviación estándar

Gráfico 8. Medianas del reflejo de retirada de la pata izquierda de los sapos espinales en sumación espacial entre los grupos de estudio y control.



TDDL: Tercio distal del dedo largo de la pata del sapo
 TDL : Totalidad del dedo largo de la pata del sapo
 TP : Totalidad de la pata del sapo

De la tabla 4 y gráfico 8, Ketorolaco produjo menor número de reflejo de retirada de la pata izquierda del sapo espinal en sumación espacial en comparación al grupo de memantina y control al exponerse el tercio distal del dedo largo y la totalidad del dedo a 0.3% de H_2SO_4 . Se encontró diferencia estadística significativa entre los grupos de ketorolaco frente al control al exponerse la totalidad del dedo y la totalidad de la pata del sapo a 0.3% de H_2SO_4 (Según la prueba U Mann Whitney $p < 0,007$ y $0,001$ respectivamente) Se encontró diferencia estadística significativa entre el grupo de memantina y control al exponerse la totalidad de la pata a 0.3% de H_2SO_4 (según la prueba U Mann Whitney $p < 0.030$)

4.3. Evaluación de la actividad electromiográfica del músculo semimembranoso, de la pata del sapo inducido por ácido sulfúrico en sapos espinales.

Figura 16. Electromiografía del músculo semimembranoso, después de la administración de suero fisiológico, inducido por 0.5% de H_2SO_4

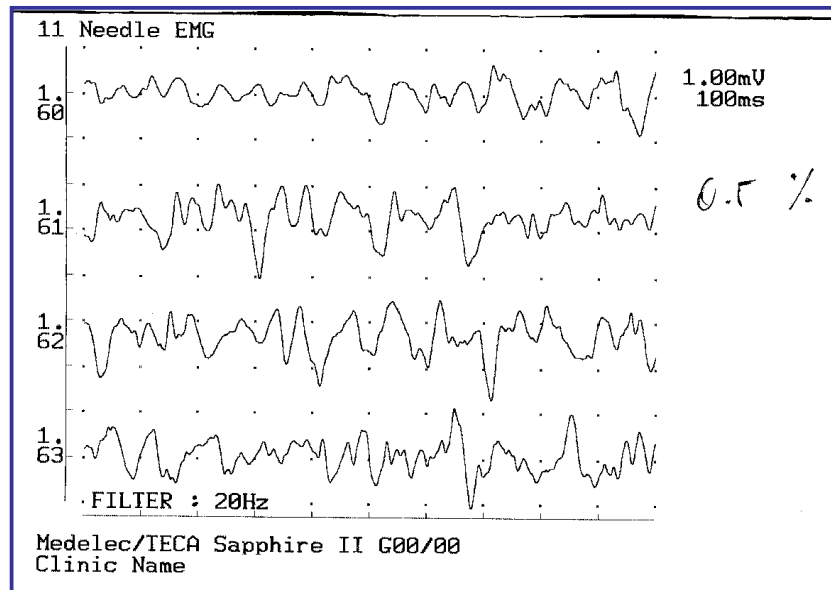
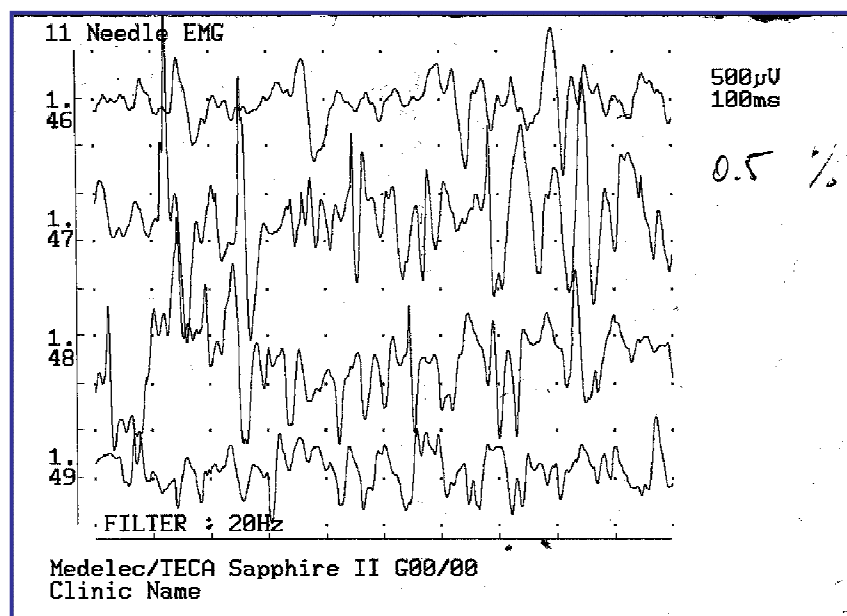


Figura 17. Electromiografía del músculo semimembranoso, después de la administración de suero fisiológico, inducido por 0.5% de H_2SO_4



De acuerdo a la prueba electromiográfica se observó que el patrón de la frecuencia y amplitud de la contracción muscular es variable en los diferentes sapos. (Fig. 16 y 17).

Figura 18. Electromiografía del músculo semimembranoso inducido por 0.5% de H_2SO_4 , después de la administración de ketorolaco.

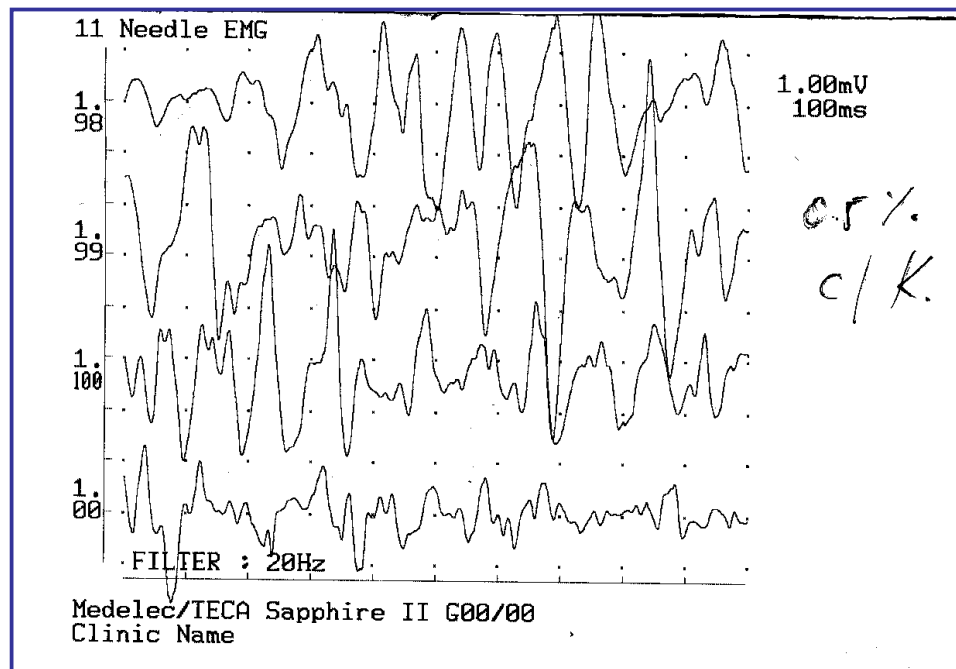
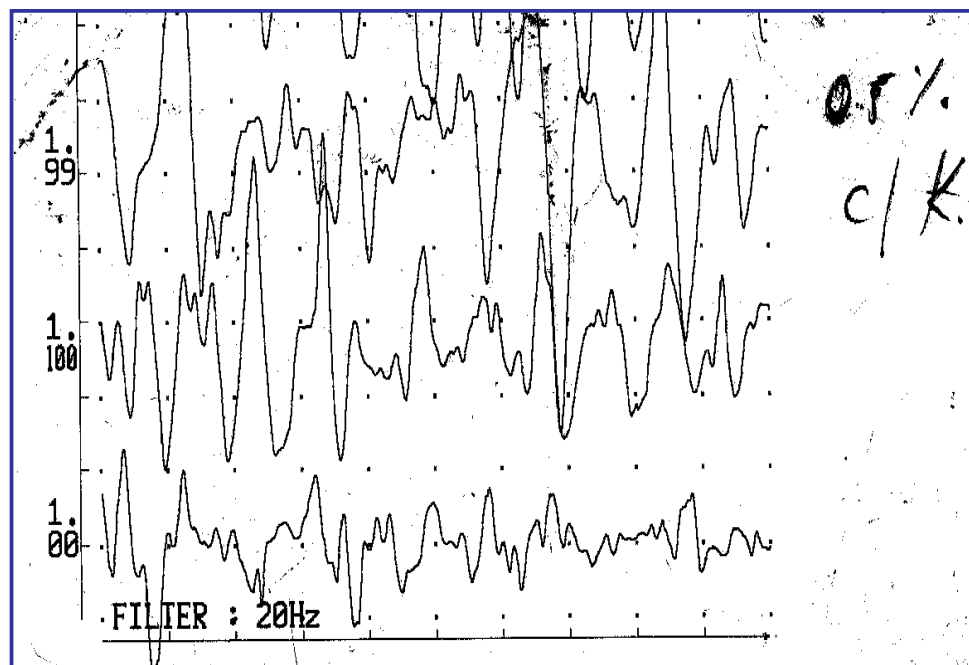


Figura 19. Electromiografía del músculo semimembranoso inducido por 0.5% de H_2SO_4 , después de la administración de ketorolaco.



De los sapos espinales a quienes se les administró ketorolaco y se les indujo estimulación con 0.5% de H_2SO_4 , se observó disminución de la frecuencia y amplitud en el cuarto y tercer nivel de lectura de la electromiografía del músculo semimembranoso (Figura 18 y 19 respectivamente).

Figura 20. Electromiografía del músculo semimembranoso inducido por 1% de H_2SO_4 después de la administración de ketorolaco.

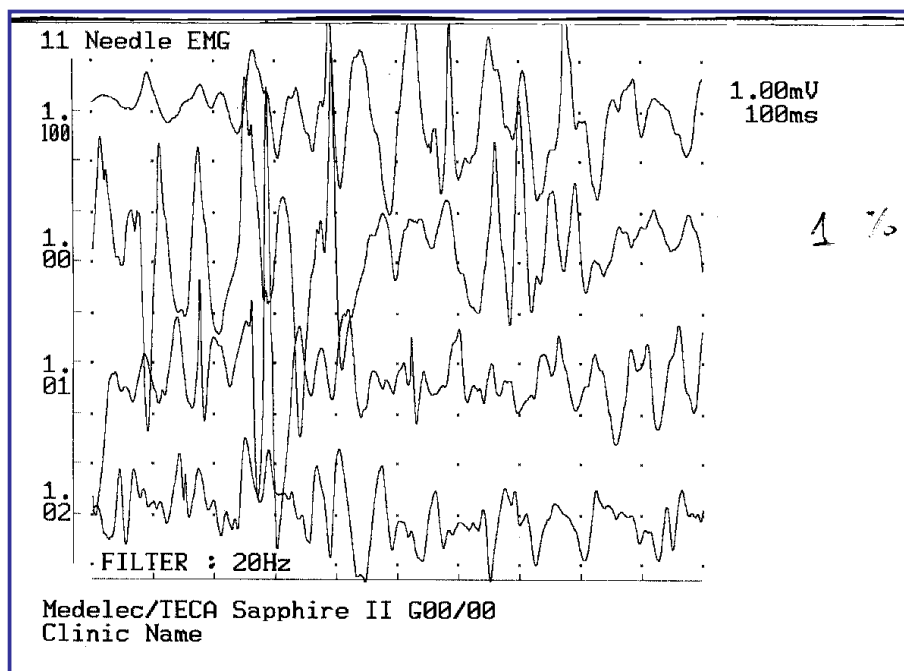
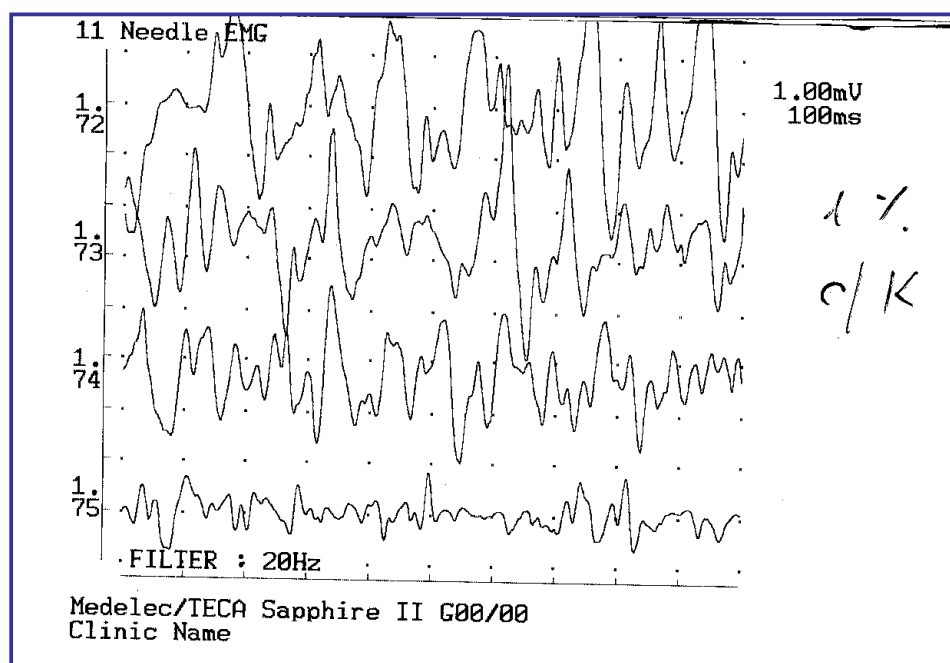


Figura 21. Electromiografía del músculo semimembranoso inducido por 1% de H_2SO_4 después de la administración de ketorolaco.



A los sapos a quienes se les administró ketorolaco y se les indujo estimulación con 1% de H_2SO_4 , se observó disminución de la frecuencia y amplitud en el cuarto nivel de lectura de la electromiografía del músculo semimembranoso (Figura 20 y 21 respectivamente).

V. DISCUSIÓN

La investigación básica y clínica ha avanzado mucho en los últimos años en su intento de conocer a fondo los mecanismos íntimos de la nocicepción¹ Esto ha sido posible gracias al estudio en los diferentes modelos experimentales de dolor con animales²³.

Para el estudio experimental de dolor agudo se emplean animales en estado consciente^{21,23} lo que va influir en las respuestas dolorosas que presenten los animales de experimentación de acuerdo a experiencias previas o activación de muchas interneuronas (excitatorias o inhibitorias) a nivel del sistema nervioso central (SNC). La respuesta dolorosa puede ser modulado a nivel del SNC, por lo que algunas respuestas dolorosas pueden ser modificadas⁵ el estado consciente del animal es una limitante para poder evaluar el dolor objetivamente por lo que el presente estudio tuvo el propósito de validar un nuevo modelo de dolor agudo^{21,23} basado en el modelo experimental de sumación temporal y espacial^{52,54} que emplea el animal (sapo) en estado inconsciente (espinal).

El modelo experimental de dolor agudo en sumación temporal y espacial pretende ser un arquetipo más para poder evaluar el dolor agudo. Los modelos más conocidos y estudiados del tipo somatogénico son: el test de retirada de la cola de la rata ante un estímulo térmico (Tail-flick test), test del plato o plancha caliente (Hot-plate test), estimulación de la pulpa dental, test del formol, todos estos modelos se realizan en animales en estado consciente²³. El modelo de dolor agudo de sumación espacial^{52,54} y temporal^{20,54} intenta cuantificar el dolor desde un punto de vista más fidedigno sin que exista una modulación a nivel del sistema nervioso central, este modelo permite además estudiar la actividad de los receptores de NMDA a nivel de médula espinal ya que al destruirse la porción anatómica entre la protuberancia y la médula espinal, la información nerviosa queda delimitada a nivel de la médula espinal por lo que se establece solo un arco reflejo doloroso (reflejo involuntario) al estimularse la pata trasera del sapo espinal con un agente químico (ácido sulfúrico), esta respuesta de arco reflejo se denominó como reflejo de retirada de la pata, que esta gobernado principalmente por el neurotransmisor excitatorio (glutamato)¹⁸ que activa receptores de NMDA^{1,3}, además el glutamato juega un rol importante en la transmisión del dolor en la médula espinal y los núcleos trigeminales⁸.

El modelo de dolor agudo en sumación temporal y espacial se realizó en sapos, pues estos animales poseen mayor tiempo de supervivencia (10 horas aproximadamente de

acuerdo a estudios preliminares) al realizarse la “operación espinal” a diferencia de ratones, ratas y conejos. Los sapos evidencian también menor hemorragia y pérdida de líquido cefalorraquídeo posterior a la “operación espinal” además de la ventaja de que la piel no necesita ser preparada para ser expuesta a estímulos externos dolorosos. Para el experimento de dolor agudo en sumación temporal se emplearon concentraciones crecientes de ácido sulfúrico de 0.1, 0.3, 0.5 y 1% los cuales en contacto con el tercio distal del dedo largo de la pata trasera de los sapos espinales produjeron un creciente número de reflejos de retirada de la pata. La concentración efectiva media de ácido sulfúrico fue de $0.295\% \cong 0.3\%$, que fue obtenida de entre las diferentes concentraciones que se emplearon. Esta concentración de 0.3% produjo el 50% del reflejo de retirada de la pata de los sapos espinales al estimular el tercio distal del dedo largo en relación al grupo de suero fisiológico ($p < 0,000$, Gráfico 2 y 3). La concentración de 0.5% de H_2SO_4 fue el que produjo el máximo número de reflejo de retirada de la pata; con el 1% de H_2SO_4 no se obtuvo mayor reflejo de retirada (como se creyó esperar) sino fue menor al de 0.5% de H_2SO_4 con la diferencia de que el 1% de H_2SO_4 produce mayor fuerza de contracción muscular a diferencia del 0.5% de H_2SO_4 . La explicación podría deberse a que al aumentar la concentración de ácido sulfúrico de 0.1% a 0.3% o 0.5% se produzca mayor número de reflejo de retirada de la pata es debido a que a mayor concentración de H_2SO_4 que se emplee existe mayor probabilidad de que un mayor número de moléculas de H_2SO_4 activen un mayor número de terminales nerviosas, esto puede explicar el nombre asignado de sumación temporal (en una misma unidad de tiempo, a menor concentración del estímulo químico menor probabilidad de activación de terminales nerviosas; a mayor concentración del estímulo químico mayor probabilidad de activación de mayor terminales nerviosas)

El área anatómica del tercio distal del dedo largo de la pata del sapo espinal fue determinado por experiencias de pruebas pilotos preliminares y por el presente estudio como la superficie que muestra una aceptable sensibilidad al estímulo químico (H_2SO_4) en relación a otras zonas estimuladas ($p < 0,002$, Gráfico 4).

Escasos estudios se han desarrollado para evaluar la actividad de los AINEs en el sistema nervioso central como el realizado por el método de iontoforesis (Sotgiu et al., 1998)³ pero esta es una técnica excesivamente onerosa y no se realiza en nuestro medio. El modelo de dolor agudo en sumación espacial y temporal en sapos espinales es un modelo experimental pragmático y módico que permite evaluar los receptores de NMDA de manera indirecta a nivel de la médula espinal (SNC)⁵³. En el presente estudio, de evaluación de dolor agudo empleando el modelo experimental de sumación

espacial y temporal, la memantina se empleo como un control positivo, al ser un antagonista no competitivo de receptores de NMDA permitió comparar la actividad del ketorolaco a nivel de receptores de NMDA, el suero fisiológico se empleo como un control negativo. La medición de la actividad de los receptores de NMDA al administrarse ketorolaco y memantina fue de un modo indirecto, (pues la técnica de iontoforesis,³ cromatografía de gas capilar de nitrógeno, radioinmunoensayo y anticuerpos policlonoclonales²⁵ serían los más adecuados para evaluar la actividad de los receptores de NMDA, pero son sumamente costosos y no realizan en nuestro medio. Ketorolaco es uno de los AINEs más empleados para el manejo del dolor postoperatorio, la inhibición de las COXs no explica el gran efecto analgésico, algunos autores han propuesto que el ketorolaco interfiere con la actividad de los receptores de NMDA a nivel del sistema nervioso central esto permitiría comprender su gran efecto analgésico³.

En la evaluación de dolor agudo según el modelo experimental de sumación temporal se encontró, en el presente estudio, que el Ketorolaco produjo menor número de reflejos de retirada de la pata izquierda comparado frente a memantina y suero fisiológico, al exponerse a 0.3% de ácido sulfúrico (Tabla 3 y Gráfico 6), se encontró diferencia estadística significativa entre el grupo de ketorolaco y de memantina frente al grupo control ($p<0.03$ y <0.040 respectivamente) (Gráfico 6). Al exponerse el tercio distal del dedo largo de la pata izquierda del sapo a 0.5% de ácido sulfúrico, ketorolaco y memantina presentaron un menor reflejo de retirada de la pata frente al grupo control ($p<0.00$ y $p<0.001$ respectivamente) (Gráfico 6).

Cuando se aumento la concentración del ácido sulfúrico a 1% el grupo que presentó menor reflejo de retirada de la pata fue el de memantina con respecto al control ($p<0,049$) (Gráfico 6).

Ketorolaco, según los resultados encontrados, produjo menor reflejo e retirada de la pata de los sapos espinales a concentraciones menores de ácido sulfúrico de manera semejante a memantina (antagonista no competitivo de receptores de NMDA) lo que sugiere su actividad antagónica sobre receptores de NMDA, este hallazgo es semejante al que encontraron Nielsen y Arendt-Nielsen, empleando ketamina y dextrometorfano como antagonistas de receptores de NMDA en sumación temporal⁶¹. A una mayor concentración del estímulo químico (1% de H_2SO_4) memantina presentó mayor bloqueo de los receptores de NMDA frente a ketorolaco, esto podría explicarse por que la memantina con respecto a ketorolaco presente una mayor afinidad por los receptores de NMDA o su metabolismo en el sapo, con respecto a ketorolaco, sea mucho menor.

En el modelo experimental de sumación espacial Ketorolaco disminuyó el reflejo de retirada de la pata izquierda en sapos espinales (Gráfico 7 y 8). Se encontró diferencia estadística significativa entre los grupos de ketorolaco frente al control al exponerse la totalidad del dedo y la totalidad de la pata de los sapos espinales a 0.3% de H_2SO_4 ($p < 0,007$ y $0,001$ respectivamente) (Gráfico 7 y 8). Así mismo el grupo de memantina frente al control presentó diferencia estadística significativa al exponerse la totalidad de la pata a 0.3% de H_2SO_4 ($p < 0.030$) (Gráfico 7 y 8). Al disminuir el reflejo de retirada de la pata en sumación espacial el ketorolaco frente al grupo control sugiere una actividad sobre los receptores de NMDA, pues disminuye en igual o mayor medida que memantina el reflejo de retirada de la pata de los sapos espinales.

En el modelo experimental de dolor agudo en sumación temporal y espacial ketorolaco presentó menor reflejo de retirada de la pata frente al control positivo y al negativo lo que sugiere una actividad antagónica sobre receptores de NMDA, los cuales tienen un rol esencial en la transmisión y modulación del dolor a nivel central además de participar en la contracción muscular lo que permite especular que existen receptores de NMDA relacionados con el dolor y otros receptores de NMDA relacionados con la contracción muscular^{1,20,51} o talvez sean los mismos receptores que median diferentes procesos a nivel del asta ventral de la médula espinal, sobre que tipos de receptores de NMDA ejerció actividad ketorolaco es incierto, si sobre los receptores involucrados en la contracción muscular o los relacionados con el dolor, esto debería dilucidarse con futuras investigaciones.

Para evaluar la actividad del ketorolaco a nivel del sistema nervioso central además de emplearse el modelo experimental de dolor agudo en sumación temporal y espacial se empleo la prueba de electromiografía del músculo semimembranoso, la prueba mencionada evaluó los potenciales de acción, amplitud y frecuencia de las contracciones del músculo semimembranoso. La medición fue de modo indirecto pues se evaluó indirectamente la activación de las neuronas motoras del asta ventral de la médula espinal, cuyo principal receptor para que se produzca la contracción muscular es el de NMDA. Ketorolaco, presentó interferencia en la actividad electromiográfica de la contracción del músculo semimembranoso, produciendo disminución en la frecuencia y amplitud de la contracción muscular al exponerse el tercio distal del dedo largo de la pata trasera izquierda del sapo espinal en comparación a los sapos a quienes no se les administró ketorolaco (Fig. 16-21 y anexo 9), este efecto observado permite proponer que el ketorolaco posee una actividad antagónica sobre receptores de NMDA a nivel de médula espinal.

Existen pocos estudios sobre la concentración de AINEs en el SNC⁵⁰ pues la farmacocinética de los AINEs en lugares periféricos (por ejemplo líquido sinovial) es más fácil determinarla y a la vez más estudiada en contraste la farmacocinética a nivel del SNC, la cual no ha sido estudiado existe dos razones para esto, el compartimiento del fluido cerebro espinal no puede ser fácilmente muestreado y los AINEs están extensamente unidos a proteínas plasmáticas por lo que la estimación de la medición de su concentración en fluido cerebro espinal requiere de métodos analíticos y específicos muy sensitivos⁴⁹.

Estudios recientes evidencian que los AINEs muestran un mecanismo a nivel de SNC^{30,31} por inhibición de COX-3³² (anexo 5). COX-3 es expresada a nivel de SNC en monocitos y células endoteliales por lo que es considerada uno de los mediadores de inflamación y dolor en SNC en caninos³¹ y humanos³², Así mismo los AINEs presentarían inhibición de la óxido nítrico sintasa e inhibiendo la recaptación de serotonina a nivel central^{4,63}.

El mecanismo analgésico central de ketorolaco según Gordon et al., 2002 es mucho más sensitivo a dosis bajas que a dosis altas, pues en su estudio de dolor dental encontró que la administración intramuscular de 30mg de ketorolaco produjo decremento paralelo de dolor y los niveles de PGE₂ y de TXB₂ en el lugar de la cirugía. Sin embargo la inyección de dosis bajas del fármaco (1mg de dosis intramuscular y 1mg de dosis submucoso en el lugar de la extracción) produjo analgesia sin un efecto detectable sobre los niveles de PGE₂ sugiriendo que los mecanismos centrales son responsables del efecto analgésico y no los efectos periféricos⁴⁸, en el presente estudio se empleo una dosis alta de ketorolaco (120mg/kg), el cual de acuerdo a los resultados de las pruebas de sumación temporal y espacial y la actividad electromiográfica tendría acción de tipo antagónica sobre receptores de NMDA, Gordon et al., 2002 no describe sobre que receptores actuaría ketorolaco⁴⁸ solo sugiere un mecanismo central de ketorolaco al igual que Burian et al., 2005 lo hace con diclofenaco². Según Sotgiu et al., 1998 el mecanismo de acción en el SNC de ketorolaco sería por la interferencia de la actividad de los receptores de NMDA³. En el presente estudio encontró disminución del reflejo de retirada de la pata (contracción muscular) y disminución de la actividad electromiográfica del músculo semimembranoso al inducirse con ácido sulfúrico las diferentes áreas anatómicas de la pata del sapo tanto en sumación espacial y temporal, esto se explicaría porque la activación de los receptores de NMDA en las motoneuronas α , a nivel del asta dorsal de médula espinal produce la contracción muscular. Ketorolaco

de lo expuesto anteriormente presentaría una actividad del tipo antagónica sobre receptores de NMDA³ (anexo 6).

Se sabe que los antagonistas los receptores de NMDA (Ketamina) producen anestesia general (disociativa) y analgesia, pero desafortunadamente causan además numerosos efectos adversos (perdida de memoria, efectos psicotomiméticos, ataxia e incoordinación motora, pérdida o disminución de la transmisión sináptica normal) lo que hace que no se empleen como analgésicos¹⁶. La actividad analgésica se debe al bloqueo de receptores de NMDA, relacionados con la analgesia, y el estado de anestesia general disociativa se cree es por su acción antagónica sobre otros tipos de receptores de NMDA que estarían relacionados con procesos de vigilia o de conciencia¹⁶, lo que demuestra que existen diferentes isoformas o tipos de receptores de NMDA⁵. Ketorolaco probablemente interfiere con la actividad de los receptores de NMDA³ del tipo analgésico y los de la contracción muscular, pero sería conveniente precisar conocer sobre que tipos de receptores de NMDA en particular y sobre que subunidades específicamente⁵ actúa el ketorolaco, esto es una orientación al cual se debe dirigir las futuras investigaciones.

ketorolaco presentaría una actividad antagónica sobre los receptores de NMDA en el modelo experimental de dolor agudo en sumación temporal y espacial, además disminuye la actividad electromiográfica del músculo semimembranoso; todo esto permite especular que su potente acción analgésica y su empleo frecuente en procesos postoperatorios se deba a su acción antagónica de receptores de NMDA³ y la inhibición de las COXs⁴⁸, el antagonismo de receptores de NMDA puede ser un efecto aditivo a la inhibición de las COXs. Estudios en animales también muestran que ketorolaco presenta actividad antipirética³⁸, la actividad antipirética del ketorolaco sugiere su participación a nivel del SNC³⁸.

Los fármacos, como ketorolaco, memantina, ketamina^{3,16,22}, que pueden interferir con la actividad de receptores de NMDA en el asta dorsal de la médula espinal resultan atractivos para comprender mejor la fisiopatología del dolor y optimizar cada vez el tratamiento de la compleja naturaleza del dolor. El modelo experimental de dolor agudo en sumación y temporal y espacial^{20,51,54} en sapos espinales permite evaluar el dolor desde un punto de vista más objetivo y añadir a los modelos tradicionales de estudio del dolor^{21,23} un ensayo experimental alternativo .

VI. Conclusiones

1. El modelo experimental de sumación temporal y espacial en sapos espinales es un modelo alternativo para el estudio del dolor agudo.
2. Ketorolaco y memantina presentan efecto analgésico en el modelo experimental de sumación temporal y espacial en sapos espinales.
3. ketorolaco disminuye la actividad electromiográfica, en frecuencia y amplitud, del músculo semimembranoso al ser inducida la pata trasera de los sapos espinales con ácido sulfúrico.

VII. Referencias bibliográficas

1. Burian M, Tegeder I, Seegel M, Geisslinger G. Peripheral and central antihyperalgesic effects of diclofenac in a model of human inflammatory pain. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 2003; 74: 113-120.
2. Burian M, Geisslinger G. COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. *Journal of Pharmacology & Therapeutics* 2005; article in press: 1-16.
3. Sotgiu ML, Biella G, Formaglio F, Marchettini P. Central effect of ketorolac involving NMDA receptors activity. *Brain Research* 1998; 813: 223-226.
4. Romundstad L, Stubhaug A, Niemi G, Rosseland LA, Breivik H. Adding to propacetamol to ketorolac increases the tolerance to painful pressure. *European Journal of Pain* 2005; article in press: 1-7.
5. Nishimura W, Muratani T, Tatsumi S, Sakimura K, Mishina M, Minami T, Ito S. Characterization of N-methyl-D-aspartate receptor subunits responsible for postoperative pain. *European Journal of Pain* 2005; 503: 71-75.
6. Bolshavok KV, Kim KH, Potapjeva NN, Gmiro VE, Tikhonov DB, Usherwood PNR, Mellorl IR, Magazanik LG. *Journal of Neuropharmacology* 2005; 49: 144-155.
7. Johnston IN, Westbrook RF. Inhibition of morphine analgesia by LPS: role of opioid and NMDA receptors and spinal glia. *Journal of Behavioral Brain Research* 2005; 156: 75-83.
8. Lee HoJ, Choi HS, Jung Ch Y, Ju JS, Kim SK, Bae YCh, Ahn DK. Intracisternal NMDA produces analgesia in the orofacial formalin test of freely moving rats. *Journal of Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 2004; 28: 497-503.
9. Kim HD, Lee HoJ, Choi HS, Ju JS, Jung Ch Y, Bae YCh, Ahn DK. Interleukin-1 β injected intracisternally inhibited NMDA-evoked behavioural response in the orofacial area of freely moving rats. *Journal of Neuroscience Letters* 2004; 360: 37-40.
10. Christoph T, Schiene K, Enlberger W, Chizh BA. Antiallodynic effects of NMDA glycine_B antagonists in neuropathic pain: Peripheral mechanisms. *Journal of Brain Research* 2005; 1048: 218-227.

11. Ikarashi Y, Yuzurihara M, Takahashi A, Ishimaru H. Neurochemical determination of the location of NMDA and GABA receptors on rat striatal cholinergic neurons. *Brain Research Protocols* 1999; 4: 378-382.
12. Volker LW. Block of NMDA and no NMDA receptor activation results in reduced background and evoked activity of central amygdale neurons in a model of arthritic pain. *Pain* 2004; 110:112-122.
13. Casper D, Yaparpalvi U, Reempel N, Werner P. Ibuprofen protects dopaminergic against glutamate toxicity in vitro. *Neuroscience letters* 2000; 289:201-204.
14. Mesches MH, Gemma C, Veng LM, Allgeier Ch, Young DA, Browning MD, Bickford PC. Sulindac improves memory and increases NMDA receptor subunits in aged Fischer 344 rats. *Neurobiology of Aging* 2004; 25: 315–324.
15. Zahn PK, Pogatzki-Zahn EM, Brennan TJ. Spinal administration of MK-801 and NBQX demonstrates NMDA-independent dorsal horn sensitization in incisional pain. *Journal of Pain* 2005; 114: 499-510.
16. Parsons ChG. NMDA receptors as targets for drug action in neuropathic pain. *European Journal Pharmacology* 2001; 429: 71-78.
17. Palazzo E, Marbese I, De Novelli V, Oliva P, Rossi F, Berrino L, Rossi F.sca, et al. Metabotropic an NMDA glutamate receptors participate in the cannabiod-induced antinociception. *Journal of Neuropharmacology* 2001; 40:319-326
18. Harris J, Joules C, Stanley C, Thomas P, Clarke W. Glutamate and tachykinin receptors in central sensitization of withdrawal reflexs in the decerebrated rabbit. *Experimental Physiology* 2004; 89(2); 187-198.
19. Reyes G, Medina R, Téran F, Castillo C. Caracterizaciónof the potentiation of the antinociceptive effects of diclofenac by vitamin B complex in the rat. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 1999; 42: 73-77.
20. Staud R, Vierck Ch J, Robinson ME, Price DD. Effects of the N-Methyl-D-Aspartate Receptor Antagonist Dextromethorphan on Temporal Summation of Pain Are Similar in Fibromyalgia Patients and Normal Control Subjects. *The Journal of Pain* 2005; 6: 323-332.
21. Ortega A, Roca A, Micó JA. Modelos animales de dolor. Una visión crítica. *Revista de la Sociedad española de Dolor* 2002; 9: 447-453.
22. Olivar T, Laird JMA. Efectos diferenciales del bloqueo de los receptores de N-metil-D-aspartato en los reflejos nociceptivos somáticos y viscerales. *Revista de la Sociedad española de Dolor* 2000; 7: 291-300.

23. Gonzáles-Darder JM. Modelos animales de dolor y aspectos éticos de la experimentación animal. *Revista de la Sociedad española de Dolor* 2000;7: 313-318.
24. Cull-Candy S, Brickley S, Farran M. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Current Opinion in Neurobiology* 2001; 11:327–335.
25. Rossi S, Yaksh T. Rapid quantification of the non-competitive NMDA antagonist MK-801 in canine cerebrospinal fluid and plasma by capillary gas chromatography-nitrogen phosphorus detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2003; 31: 243-250.
26. Gupta A, Cheng J, Wang S, Rarr GA. Analgesic efficacy of ketorolac and morphine in neonatal rats. *Pharmacological, Biochemistry and Behavior* 2001; 68: 635-640.
27. Broom DC, Samad TA, Kohno T, Tegeder I, Geisslinger G, Woolf CJ. Cyclooxygenase 2 expression in the spared nerve injury model of neuropathic pain. *Neuroscience* 2004; 124:891-900.
28. Schwab JM, Schluesener HJ, Laufs S. Just another COX or the solitary elusive target of paracetamol. *The Lancet* 2003; 361:981-982.
29. Warner TD, Mitchell JA. Cyclooxygenase –3 (COX-3): filling in the gaps toward a cox continuum? *PNAS* 2002; 99:13371-13373.
30. Botting R. Cox-1 and Cox-3 inhibitors. *Thrombosis Research* 2003;110: 269-272.
31. Schwab JM, Schluesener HJ, Meyermann R, Serhan Ch. COX-3 the enzyme and the concept: steps towards highly specialized pathways and precision therapeutics? *Prostaglandins, leukotrienes and Essential fatty acids* 2003; 69:339-343.
32. Kis B, Snipes A, Bari F, Busija DW. Regional distribution of cyclooxygenase-3 mRNA in the central nervous System. *Molecular Brain Research* 2004; 126:78-80.
33. Gaciong Z. The real dimension of analgesic activity of aspirin. *Thrombosis research* 2003;10:361-364.
34. Danysz W, Kozela E, Parsons Ch, Sladek M, Baver T, Popik P. Peripherally acting NMDA receptor/Glycine_B site receptor antagonist inhibit morphine tolerance 2005; 48:360-371.
35. Pizcher GM, Henry JL. Mediation y modulation by eicosanoids of responses of spinal dorsal horn neurons to glutamate and substance P receptor agonists: Results with Indomethacin in the rat in vivo. *Neuroscience* 1999; 93:1109-1121.
36. Gozariu M, Bouhassira D, Willer JC, Le Bars D. Temporal summation and a C-fibre reflex in the rat: effects of morphine on facilitatory and inhibitory mechanisms. *European Journal of Pharmacology* 2000; 394: 75–84.

37. Staud R, Vierck ChJ, Robinson ME, Price DD. Effects of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist dextromethorphan on temporal summation of pain are similar in fibromyalgia patients and normal control subjects. *The journal of pain* 2005; 6: 323-332.
38. Zanchet EM, Longo I, Cury Y. Involvement of spinal neurokinins, excitatory amino acids, proinflammatory cytokines, nitric oxide and prostanooids in pain facilitation induced by intrathecal capsaicin. *Brain research* 2004; 1021:101-111.
39. Baevsky RH, Nyquist SN, Roy MC, Smithline HA. Antipyretic effectiveness of intravenous ketorolac tromethamine. *The journal of emergency and medicine* 2004; 26:407-410.
40. Zelcer S, Kolesnikov Y, Kovalyshyn I, Pasternak DD, Pasternak GW. Selective potentiation of opioid analgesia by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Brain research* 2005; 1040:151-156.
41. López-Muñoz FJ, Díaz-Reval MA, Terrón JA, Campos MD. Analysis of the analgesic interactions between ketorolac and tramadol during arthritic nociception in rat. *European Journal of pharmacology* 2004; 484:157-167.
42. Vane, J R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* 1971; 231: 232–235.
43. Hemler M, Lands WE. Purification of the cyclooxygenase that forms prostaglandins: demonstration of two forms of iron in the holoenzyme. *J Biol Chem* 1976; 251: 5575– 5579.
44. Kujubu DA, Fletcher B S, Varnum BC, Lim RW, Herschman H R. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem* 1991; 266: 12866– 12872.
45. Hla T, Neilson K. Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 7384– 7388.
46. McCormack K, Brune K. Dissociation between the antinociceptive and anti-inflammatory effects of the nonsteroidal anti-inflammatory drugs: a survey of their analgesic efficacy. *Drugs* 1991; 41: 533– 547.
47. Kaufmann W E, Andreasson KI, Isakson PC, Worley P F. Cyclooxygenases and the central nervous system. *Prostaglandins* 1997; 54:601– 624.
48. Schou S, Nielsen H, Nattestad A, Hillerup S, Ritzau M, Branebjerg PE. Analgesic dose –response relationship of ibuprofen 50, 100, 200 and 400 mg after surgical

- removal of third molars: a single-dose, randomized, placebo-controlled, and double-blind study in 304 patients. *J Clin Pharmacol* 1998; 447–454.
49. Gordon SM, Brahim JS, Rowan J, Kent A, Dionne RA. Peripheral prostanoid levels and nonsteroidal anti-inflammatory drug analgesia: replicate clinical trials in a tissue injury model. *Clin Pharmacol Ther* . 2002; 72: 175– 183.
 50. Bannwarth B, Netter P, Pourel J, Royer RJ, Gaucher A. Clinical pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the cerebrospinal fluid. *Biomed Pharmacother* 1989;43: 121– 126.
 51. Bannwarth B, Nette, P, Lopicque F, Pere P, Thomas P, Gaucher A. Plasma and cerebrospinal fluid concentrations of indomethacin in humans: relationship to analgesic activity. *Eur J Clin Pharmacol* 1990; 38: 343– 346.
 52. Ge H-Y, Madeleine P, Wang K, Arendt-Nielsen L. Hypoalgesia to pressure pain in referred pain areas triggered by spatial summation of experimental muscle pain from unilateral or bilateral trapezius muscles. *European Journal of Pain* 2003; 7:531–537.
 53. International Association for the Study of Pain. [Home page on the internet]. [actualizado el 3 de enero del 2007] Disponible en:<http://www.iasp-pain.org>.
 54. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; Facultad de Medicina, Departamento Académico de Fisiología. Guía de Prácticas de Fisiología. Lima (Perú); 2006.
 55. Eide PK. Wind-up and the NMDA receptor complex from a clinical perspective. *European Journal of Pain* 2000;4: 5–17.
 56. Mendell LM. Physiological properties of unmyelinated fiber projection to the spinal cord. *Exp Neurol* 1966; 16:316–332.
 57. Mendell LM, Wall PD. Responses of single dorsal cord cells to peripheral cutaneous unmyelinated fibres. *Nature*1965; 206: 97–99.
 58. The amygdala: Different pains, different mechanisms. *Pain* 2007; 127:1–2.
 59. Robinson ME, Wise EA, Gagnon Ch, Fillingim RB, Price DD. Influences of Gender Role and Anxiety on Sex Differences in Temporal Summation of Pain. *The Journal of Pain* 2004; 5:77-82.
 60. Edwards RR, Fillingim RB. Effects of Age on Temporal Summation and Habituation of Thermal Pain: Clinical Relevance in Healthy Older and Younger Adults. *The Journal of Pain* 2001; 2:307-317.
 61. Nielsen J, Arendt-Nielsen L. The importance of stimulus configuration for temporal summation of first and second pain to repeated heat stimuli. *European Journal of Pain* 1998; 2: 329-341.

62. Enriquez E, Sabaté M, Sánchez O. Electrodiagnóstico y electromiografía. Biofeedback. In: Martínez M, Pastor JM, Sendra F. España: Harcourt Brace; 1998. 201-209.
63. Díaz-Reval MI, Ventura-Martínez R, Déciga-Campos R, Terrón FC, López-Muñoz FJ. Evidence for a central mechanism of action of S-(+)-ketoprofen. *European Journal of Pharmacology* 2004; 483: 241– 248.

VIII

ANEXOS

ANEXO 1

Fichas de registro de sumación espacial y temporal del grupo control

Administración de Suero				
Sumación Espacial				
	PESO	ACIDO SULFÚRICO 0,3%	ACIDO SULFÚRICO 0,3%	ACIDO SULFÚRICO 0,3%
Suero 1				
Suero 2				
Suero 3				
Suero 4				
Suero 5				
Suero 6				
Suero 7				
Suero 8				
Suero 9				
Suero 10				
PROMEDIO				

ADMINISTRACIÓN DE SUERO					
Sumación Temporal					
	PESO	ACIDO SULFÚRICO 0,1%	ACIDO SULFÚRICO 0,3%	ACIDO SULFÚRICO 0,5%	ACIDO SULFÚRICO 1,0%
Suero 1					
Suero 2					
Suero 3					
Suero 4					
Suero 5					
Suero 6					
Suero 7					
Suero 8					
Suero 9					
Suero 10					
PROMEDIO					

ANEXO 2

Ficha de registro de sumación espacial y temporal para el grupo ketorolaco

Administración de Ketorolaco				
Sumación Espacial				
	PESO	ACIDO SULFÚRICO 0,3%	ACIDO SULFÚRICO 0,3%	ACIDO SULFÚRICO 0,3%
Ketorolaco 1				
Ketorolaco 2				
Ketorolaco 3				
Ketorolaco 4				
Ketorolaco 5				
Ketorolaco 6				
Ketorolaco 7				
Ketorolaco 8				
Ketorolaco 9				
Ketorolaco 10				
PROMEDIO				

ADMINISTRACIÓN DE KETOROLACO					
Sumación Temporal					
	PESO	ACIDO SULFÚRICO 0%	ACIDO SULFÚRICO 0,3%	ACIDO SULFÚRICO 0,5%	ACIDO SULFÚRICO 1,0%
Ketorolaco 1					
Ketorolaco 2					
Ketorolaco 3					
Ketorolaco 4					
Ketorolaco 5					
Ketorolaco 6					
Ketorolaco 7					
Ketorolaco 8					
Ketorolaco 9					
Ketorolaco 10					
PROMEDIO					

ANEXO 3

Ficha de registro de sumación temporal para el grupo Memantina

Administración de Memantina				
Sumación Espacial				
	PESO	ACIDO SULFÚRICO 0,3%	ACIDO SULFÚRICO 0,3%	ACIDO SULFÚRICO 0,3%
Memantina 1				
Memantina 2				
Memantina 3				
Memantina 4				
Memantina 5				
Memantina 6				
Memantina 7				
Memantina 8				
Memantina 9				
Memantina 10				
PROMEDIO				

ADMINISTRACIÓN DE MEMANTINA					
Sumación Temporal					
	PESO	ACIDO SULFÚRICO 0%	ACIDO SULFÚRICO 0,3%	ACIDO SULFÚRICO 0,5%	ACIDO SULFÚRICO 1,0%
Memantina 1					
Memantina 2					
Memantina 3					
Memantina 4					
Memantina 5					
Memantina 6					
Memantina 7					
Memantina 8					
Memantina 9					
Memantina 10					
PROMEDIO					

ANEXO 4

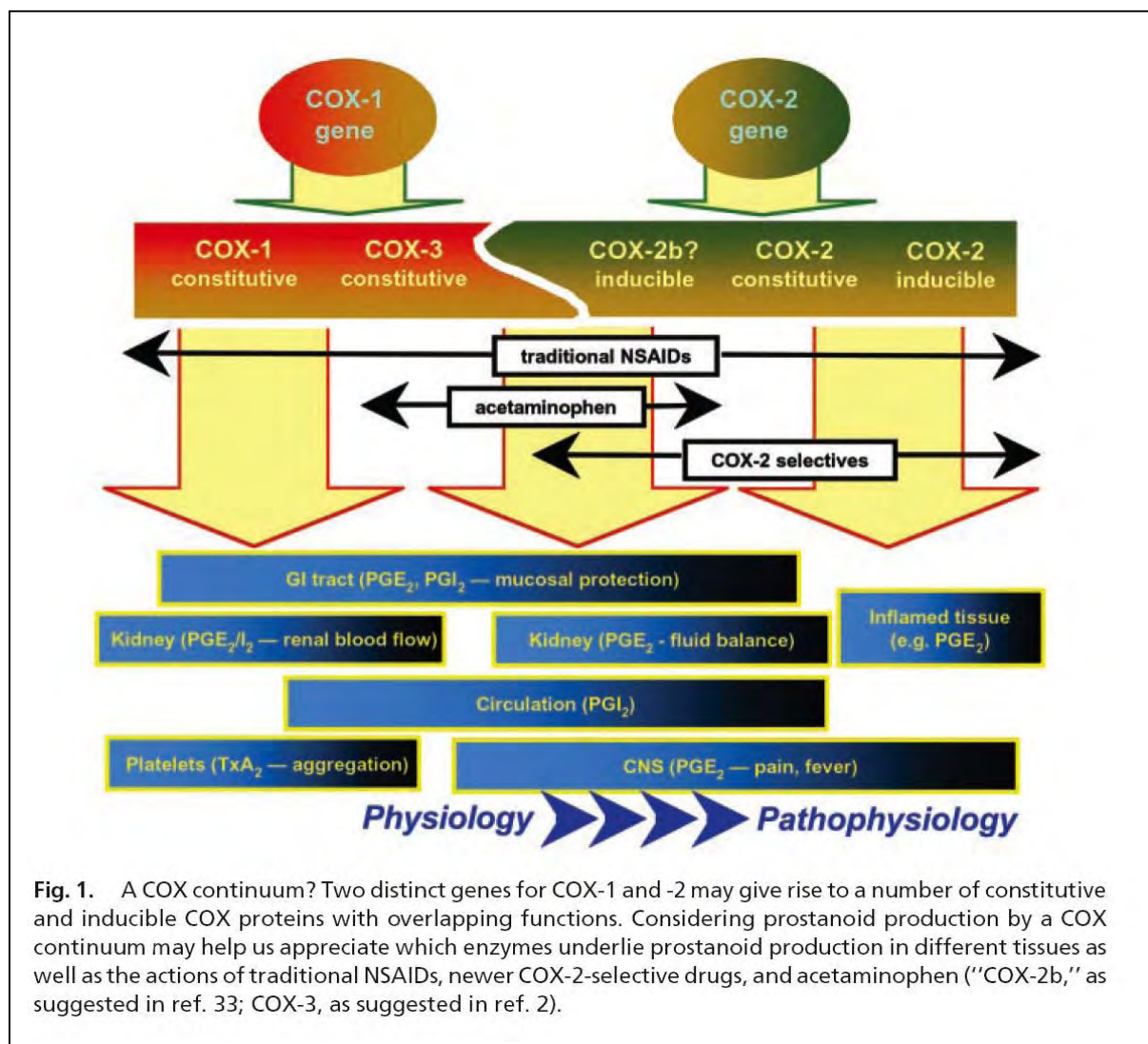
Peso de los sapos de los diferentes grupos de estudio

	Grupos		
Animal	Control (g)	Ketorolaco (g)	Memantina (g)
Sapo 1	115	113	110
Sapo 2	115	115	118
Sapo 3	116	120	115
Sapo 4	115	113	112
Sapo 5	110	114	114
Sapo 6	115	118	113
Sapo 7	112	112	114
Sapo 8	115	116	119
Sapo 9	113	110	114
Sapo 10	115	114	113
Promedio	114,1	114,5	114,2

Los pesos de los sapos variaron en un rango de 10 gramos como máximo en cada uno de los grupos.

ANEXO 5

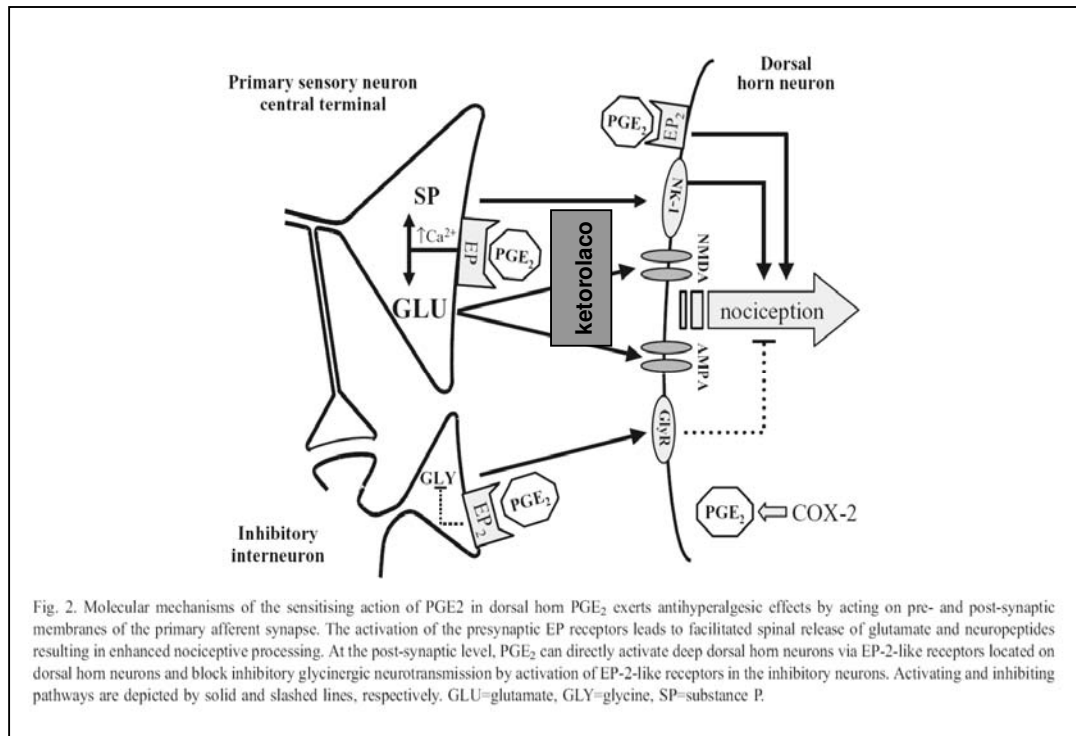
Acción de los AINEs sobre el SNC



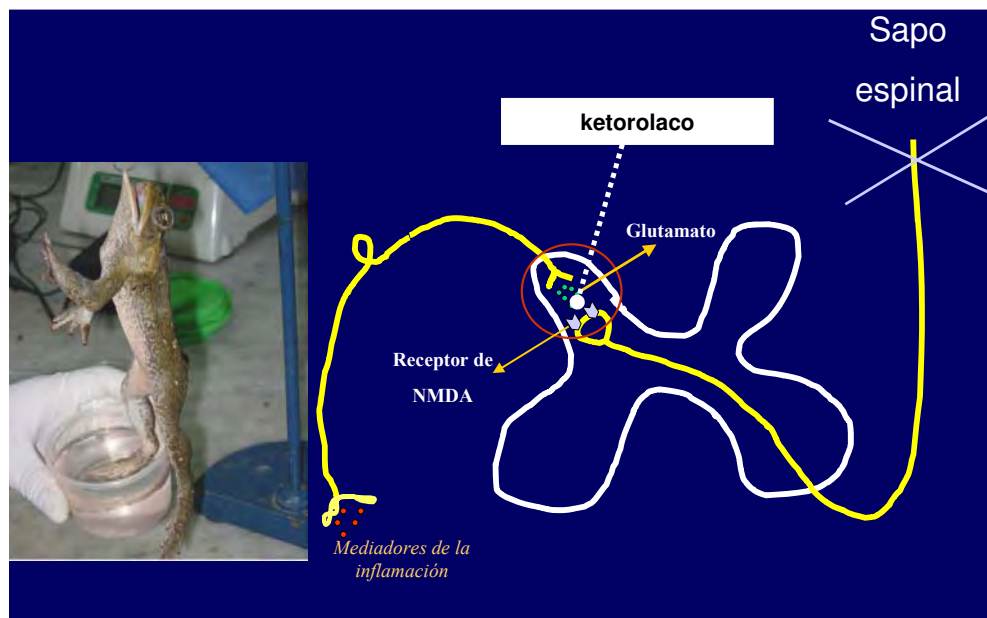
Warner TD, Mitchell JA. Cyclooxygenase -3 (COX-3): filling in the gaps toward a cox continuum? PNAS 2002; 99:13371-13373.

ANEXO 6

Posible mecanismo de acción de ketorolaco, bloqueo receptores de NMDA en el SNC.



Burian M, Geisslinger G. COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. *Journal of Pharmacology & Therapeutics* 2005; article in press: 1-16.



Posible mecanismo de acción ketorolaco, bloqueo de receptores de NMDA en el SNC en sapos espinales.